



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI
CAMPUS MINISTRO PETRÔNIO PORTELA
CENTROS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DANIELA KUNKEL

**ENALAPRILATO NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES E GEL
DE ENALAPRIL POR VIA INTRAVAGINAL EM BOVINOS**

**Teresina
2020**

DANIELA KUNKEL

**ENALAPRILATO NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES E GEL
DE ENALAPRIL POR VIA INTRAVAGINAL EM BOVINOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, do Centro de Ciências Agrárias, da
Universidade Federal do Piauí, como parte dos
requisitos para a obtenção do Título de Doutor (a)
em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução
Animal.

**Professor Orientador: Amilton Paulo
Raposo Costa**

Teresina
2020

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação da Informação

K96e Kunkel, Daniela.
Enalaprilato na produção in vitro de embriões e gel de enalapril por via intravaginal em bovinos / Daniela Kunkel. -- 2020.
86 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Teresina, 2023.
“Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa.”

1. Inibidor da ECA. 2. Oócitos. 3. PIV. 4. Blastocisto. 5. Clivagem. 6. Complexação de fármacos I. Costa, Amilton Paulo Raposo. II. Título.

CDD 636.21

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

**ENALAPRILATO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E GEL
DEENALAPRIL POR VIA INTRAVAGINAL EM BOVINOS**

DANIELA KUNKEL

Tese aprovada em: 07/07/2020

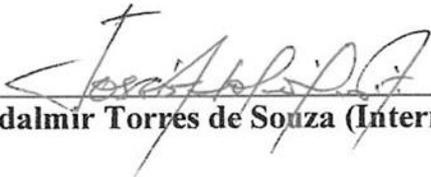
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



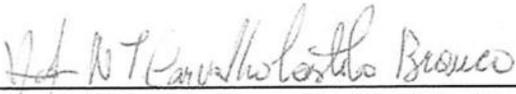
Prof. Dr. Manoel Lopes da Silva Filho (Interno) / CPCE/UFPI



Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (Interno) / DCCV/CCA/UFPI



Prof. Dr. Marlon de Araújo Castelo Branco (Externo) / UNINASSAU



Profa. Dra. Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco (Externa) / UFS

À Deus, pelos dons recebidos, por proporcionar um momento tão importante em minha vida profissional e por me guiar e abençoar durante essa caminhada concedendo força e determinação para superar todos os obstáculos encontrados pelo caminho.

Aos meus pais Benno e Marli Kunkel, pelo exemplo de garra e superação nos momentos em que a vida se mostra mais adversa e pelo apoio incondicional.

Ao meu irmão Adriano Kunkel, pelo apoio, incentivo e companheirismo em todos os momentos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, professor Dr. Amilton Paulo Raposo Costa, pelas oportunidades e pela confiança depositada no meu trabalho.

Ao professor Dr. José Adalmir Torres de Souza, pela oportunidade de usufruir a estrutura do Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí.

Ao professor Dr. André Luís Menezes Carvalho, pelas ideias, pela colaboração e por disponibilizar alunos de pós-graduação e alunos de iniciação científica para auxiliar na realização do trabalho e por conceder acesso aos laboratórios da Farmácia Escola e dos laboratórios do Curso de Farmácia da UFPI.

Ao professor Dr. Manoel Lopes da Silva Filho, pelo apoio incondicional, pela amizade.

À Emanuela Ribeiro Moura, Jamilly Érica Sousa Campello, Anna Monallysa Silva de Oliveira, Larissa dos Santos Sousa, ao Muriel Alves Carvalho, Filipe Nunes, Marco Antônio Celestino de Sousa, Maria Micheli Araújo de Sousa Cavalcante, Misael das Virgens Santana, Ideljane de Sena Rosa Filho e Jonathan Iago Costa Silva sem ajuda de vocês o trabalho não teria sido realizado, muito obrigada pela amizade, ajuda e apoio.

À Marchetaria Santa Rita, por conceder acesso e disponibilizar a coleta do material necessário para a realização do trabalho.

Ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Petrônio Portela, por disponibilizar os animais para a realização do trabalho.

À Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Petrônio Portela, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade de poder graduar-me no doutorado.

Ao CNPq, pelo incentivo da concessão da bolsa para o doutorado, assim como pelo auxílio financeiro para aquisição de insumos utilizados neste projeto, por meio do Edital Universal de 2016 (Processo 429648/2016-2).

RESUMO

KUNKEL, D. ENALAPRILATO NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES E GEL DE ENALAPRIL POR VIA INTRAVAGINAL EM BOVINOS 2020.86f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2020.

O objetivo dessa pesquisa foi estudar alternativas de complexação do enalapril com outras substâncias, visando sua aplicabilidade prática nos protocolos de biotecnologia da reprodução em animais, além de verificar os efeitos do enalaprilato e A-779 na maturação oocitária, fertilização e cultivo de embriões in vitro. No capítulo “Avaliação da dose efetiva do gel de enalapril” em bovinos os animais foram submetidos a uma avaliação clínica previa incluindo a pressão arterial média. As fêmeas escolhidas aleatoriamente receberam por via intravaginal o gel de enalapril nas doses de 0,4 mg/kg, 0,6 mg/kg e 0,8 mg/kg de peso vivo. Em relação ao capítulo “Enalaprilato na produção in vitro de embriões bovinos” Os ovários foram obtidos de abatedouros com inspeção municipal. Os oócitos coletados foram cultivados na ausência (controle) e na presença de enalaprilato nas concentrações: 1 μ M, 2 μ M e 4 μ M. As etapas de aspiração dos folículos antrais, maturação, fertilização e cultivo foram realizados de acordo com a técnica de produção in vitro de embriões já estabelecida. O mesmo procedimento ocorreu no capítulo “Influencia do enalaprilato e do inibidor da angiotensina (1-7) na produção in vitro de embriões bovinos”, porém os oócitos utilizados foram cultivados na ausência e na presença de enalaprilato a 2 μ M, A-779 a 2 μ M e enalaprilato a 2 μ M + A-779 a 2 μ M. Os resultados para o experimento de avaliação da dosagem de enalapril para bovinos administrado por via intravaginal utilizando as concentrações 0,4 mg/kg, 0,6 mg/kg e 0,8 mg/kg não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) na avaliação da variável pressão arterial média, assim como não houve alteração nos níveis de ureia, creatinina, TGO, TGP e aldosterona. Em relação a utilização do enalaprilato nas concentrações 1 μ M, 2 μ M e 4 μ M em todas as fases da produção in vitro de embriões os resultados demonstram que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos para a taxa de clivagem e para a taxa de blastocisto. Para os tratamentos com A-779 a 2 μ M Enalaprilato a 2 μ M e Enalaprilato a 2 μ M + A-779 a 2 μ M não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) na taxa de clivagem e para a taxa de blastocisto. Com relação à qualidade avaliada por meio do número de células da massa celular interna (MCI), número de células do trofoblasto (TE) e a proporção entre MCI e número total de células (TC), verificou-se em relação ao número de células TE e TC que os tratamentos com A-779, enalaprilato e

associação entre eles apresentaram maior número de células em relação ao controle. Quando foi analisada a proporção entre MCI e TC observou-se que 100% dos embriões do tratamento Enal a 2 μ M +A779 a 2 μ M, 65% dos tratados com Enal a 2 μ M, 50% dos tratados com A-779 e apenas 33,3% do grupo controle estavam dentro da faixa de 20 a 40% de células da MCI, considerada de melhor qualidade. Conclui-se que o enalaprilato não influenciou na produção in vitro de embriões bovinos, quando avaliados pelas técnicas convencionais, porém quando se avalia pelo número de células embrionárias e a proporção entre elas, os tratamentos com o enalaprilato, A-779 e enalaprilato associado com A-779 apresentaram efeito proliferativo para as células embrionárias, em especial para a massa celular interna, e efeito positivo para a qualidade embrionária avaliada pela proporção de células. Já para o gel de enalapril conclui-se que não houve o efeito do gel nas doses de 0,4, 0,6 e 0,8 mg/kg quando aplicados por via intravaginal.

Palavras-chave: inibidor da ECA, oócitos, PIV, blastocisto, clivagem, complexação de fármacos

ABSTRACT

KUNKEL, D. ENALAPRILAT PRODUCTION IN VITRO EMBRYOS AND ENALAPRIL GEL IN VIA INTRAVAGINAL IN CATTLE 2020.86f. Thesis (Doctorate in Animal Science) -Program Graduate in Animal Science, Federal University of Piauí, Teresina, 2020.

The objective of this research was to study alternatives for the complexation of enalapril with other substances, aiming at its practical applicability in animal reproduction biotechnology protocols, in addition to verifying the effects of enalapril and A-779 on oocyte maturation, fertilization and in vitro embryo culture. In the chapter “Assessment of the effective dose of enalapril gel” in cattle, the animals were submitted to a previous clinical evaluation including mean arterial pressure. Females chosen at random received enalapril gel intravaginally at doses of 0.4 mg/kg, 0.6 mg/kg and 0.8 mg/kg of body weight. Regarding the chapter “Enalaprilat in the in vitro production of bovine embryos” The ovaries were obtained from slaughterhouses with municipal inspection. The collected oocytes were cultured in the absence (control) and in the presence of enalaprilat at concentrations: 1 μM , 2 μM and 4 μM . The steps of aspiration of the antral follicles, maturation, fertilization and culture were carried out according to the already established in vitro embryo production technique. The same procedure was performed in the chapter “Influence of enalaprilat and angiotensin inhibitor (1-7) on the in vitro production of bovine embryos”, but the oocytes used were cultured in the absence and presence of 2 μM enalaprilat, A-779 a 2 μM and 2 μM enalaprilat + 2 μM A-779. The results for the experiment evaluating the dosage of enalapril for cattle administered intravaginally using the concentrations 0.4 mg/kg, 0.6 mg/kg and 0.8 mg/kg did not show significant difference ($p>0.05$) in the evaluation of the mean arterial pressure variable, as well as there was no change in the levels of urea, creatinine, TGO, TGP and aldosterone. Regarding the use of enalaprilat at 1 μM , 2 μM and 4 μM concentrations in all stages of in vitro embryo production, the results show that there was no significant difference ($p>0.05$) between treatments for the cleavage rate and for blastocyst rate. For the treatments with A-779 at 2 μM Enalaprilat at 2 μM and Enalaprilat at 2 μM + A-779 at 2 μM , there was no significant difference ($p>0.05$) in the cleavage rate and for the blastocyst rate. Regarding the quality evaluated by means of the number of cells in the inner cell mass (ICM), number of trophoblast cells (TE) and the ratio between ICM and total number of cells (TC), it was verified in relation to the number of cells TE and TC than the treatments with A-779, enalaprilat and association between them showed a higher number of cells in relation to the control. When the proportion between MCI and TC was analyzed, it was observed that 100% of the embryos treated with 2 μM Enal + 2 μM A779, 65% of those treated with 2 μM Enal, 50% of those treated with A-779 and only 33.3% of the control group were within the range of 20 to 40% of cells of the MCI, considered of better quality. It is concluded that enalaprilat did not influence the in vitro production of bovine embryos, when evaluated by conventional techniques, but when evaluated by the number of embryonic cells and the proportion between them, treatments with enalaprilat, A-779 and enalaprilat associated with A-779 showed a proliferative effect on embryonic cells, especially on the inner cell mass, and a positive effect on

embryonic quality assessed by the proportion of cells. As for the enalapril gel, it was concluded that there was no effect of the gel at doses of 0.4, 0.6 and 0.8 mg/kg when applied intravaginally.

Key words: ACE inhibitor, oocytes, PIV, blastocyst, cleavage, drug complexation.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1: Esquema geral do sistema renina-angiotensina ----- 22

FIGURA 2: Esquema das vias de atuação do sistema renina angiotensina no ovário e no testículo ----- 23

CAPÍTULO 1

FIGURA 1: Esquema de horários para a mensuração da pressão arterial média ----- 39

FIGURA 2: Representação esquemática do delineamento alternado (*cross over*) durante a aplicação de enalapril por via intravaginal ----- 40

FIGURA 3: Pressão arterial média de fêmeas bovinas submetidas ao gel de enalapril nas concentrações de 0,4mg/kg, 0,6 mg/kg e 0,8mg/kg por via intravaginal ----- 41

FIGURA 4: Avaliação da pressão arterial média (PAM) de fêmeas bovinas submetidas ao gel de enalapril por vi intravaginal durante experimento piloto. (P=0,80) ----- 41

FIGURA 5: Níveis de aldosterona em fêmeas bovinas submetidas a administração intravaginal de gel de enalapril (P=0,4) ----- 43

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1: Análise bioquímica dos animais submetidos a aplicação do gel de enalapril por via intravaginal -----	44
---	----

CAPÍTULO 2

TABELA 1: Taxa de clivagem de oócitos bovinos, cultivados em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de enalaprilato -----	54
TABELA 2: Taxa de blastocisto e estruturas encontradas no D7 e taxa de blastocisto eclodido no D9 de oócitos bovinos, cultivados em meio acrescidos de enalaprilato ----	54
TABELA 3: Classificação da qualidade dos blastocistos bovinos no D7 submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de enalaprilato -----	55

CAPÍTULO 3

TABELA 1: Taxa de clivagem de oócitos bovinos, cultivados em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de enalaprilato e A-779 -----	68
TABELA 2: Taxa de blastocisto e estruturas encontradas no D7 de oócitos bovinos, cultivados em meio acrescidos de enalaprilato e A-779 -----	68
TABELA 3: Classificação da qualidade dos blastocistos bovinos no D7 submetidos ao tratamento com meios acrescido de enalaprilato e A-779 -----	69
TABELA 4: Variáveis de alocação celular de embriões produzidos em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de enalaprilato e A-779 -----	70
TABELA 5: Proporções de MCI/TC (%) de embriões produzidos em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de enalaprilato e A-779 -----	70

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: graus Celsius

μL: microlitro

μM: micromolar

A-779: d-Ala⁷-Ang-(1-7)

AMPc: adenosina monofosfatase cíclica

Ang-(1-7): angiotensina-(1-7)

Ang-I: angiotensina I

Ang-II: angiotensina II

Ang-III: angiotensina III

AT1: receptor tipo 1 da angiotensina II

AT2: receptor tipo 2 da angiotensina II

bFGF: fator decrescimento fibroblástico

BHT: hidroxitolueno butilado

BSA: albumina sérica bovina

CCOs: complexo cumulus-oócitos

CIV: cultivo in vitro

CO₂: dióxido de carbono

dL: decilitro

DMPBS: solução tamponada de Dubbeco modificada fosfatada

E2: estradiol

ECA: enzima conversora da angiotensina

ECA2: enzima conversora da angiotensina 2

eCG: gonadotrofina coriônica equina

EFG: fator de crescimento epidérmico

EPM: erro padrão da média

Ereg: marcador inicial da cascata de ovulação

FIV: fertilização in vitro

FSH: hormônio folículo estimulante

GMPc: guanosina monofosfatase cíclica

GnRH: hormônio liberador da gonadotrofina

h: hora

H₂O₂: peróxido de oxigênio

H33342: hoerchst H33342

hCG: gonadotrofina coriônica humana

IATF: inseminação artificial em tempo fixo

IECAS: inibidores da enzima conversora da angiotensina

IETS: sociedade internacional de tecnologia de embriões

IGF-1: fator de crescimento semelhante a insulina

IP: iodeto de propídeo

KG: quilogramas

KSOM: meio simples de potássio otimizado

LH: hormônio Luteinizante

MAPK: proteína cinase ativadora do mitogênio

MAS: receptor da angiotensina-(1-7)

MCI: massa celular interna

mg: miligrama

MIV: maturação in vitro

MKp-1: proteína fosfatase 1 dupla especificidade

mL: mililitro

mM: milimolar

mmHG: milímetros de mercúrio

MPF: fator promotor da maturação

N₂: nitrogênio

NAPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NEP: endopeptidase neutra

ng: nanograma

nm: nanômetro

NO: óxido nítrico

O₂: oxigênio

PAM: pressão arterial média

PCP: prolil-carboxipeptidase

PDE3A: fosfodiesterase

PEP: prolil-endopeptidase

PHE: penicilina, hipotaurina e epinefrina

PI3K/AKT: via do fosfatidil – inositol 3 - fosfatase

PIV: produção in vitro de embriões

PMSG: gonadotrofina sérica da égua prenhe

PP2A: proteína fosfatase 2^a

RNA_m: ácido ribonucleíco mensageiro

ROS: espécies reativas de oxigênio

RPM: rotação por minuto

SFB: soro fetal bovino

SHP-1: src homólogo a fosfatase

SOF: *synthetic oviductal fluid*

SRA: sistema renina angiotensina

TC: número total de células

TCM 99: *tissue culture médium 199*

TE: trofoblasto

TGFβ1: fator de crescimento transformador beta 1

TGO: transaminase glutâmico oxalacética

TGP: transaminase glutâmico pirúvica

VEGF: fator de crescimento endotelial

VERO: linhagens celulares estabelecidas para cultivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Ciclo Estral.....	19
2.2 Sistema Renina Angiotensina (SRA)	21
2.3 Sistema Renina Angiotensina Ovariano.....	22
2.4 Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECAs).....	23
2.4.1 Ação dos inibidores da ECA no trato reprodutivo	24
2.5 Função ovariana e esteroidogênese	25
2.6 Produção in vitro de embriões (PIV).....	26
2.6.1 Maturação in vitro (MIV).....	27
2.6.2 Fecundação in vitro (FIV).....	29
2.6.3 Cultivo in vitro (CIV).....	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
4 ESTRUTURA DA TESE.....	33
5 CAPÍTULO 1	34
Avaliação da dose efetiva do gel de enalapril em bovinos.....	34
Resumo.....	35
Introdução	36
Material e Métodos	37
Resultados e Discussão	40
Conclusão.....	44
Referências.....	44
6 CAPÍTULO 2	47
Enalaprilato na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	47
Resumo.....	48
Introdução	49
Material e Métodos	51
Resultados	53
Discussão.....	55
Referências.....	57
7 CAPÍTULO 3	61

Influência do enalaprilato e do inibidor da angiotensina (1-7) na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	61
Resumo.....	62
Introdução	63
Materiais e Métodos	65
Resultados	68
Discussão.....	71
Referências.....	74
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	80

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é considerado um dos maiores rebanhos comerciais do mundo, com um efetivo de aproximadamente 212.797.824 milhões de cabeças, tornando-se assim o maior exportador mundial de carne bovina. O Piauí possui um rebanho de aproximadamente 1.688.024 de cabeças, sendo o quinto colocado em produção de bovinos de corte na Região Nordeste (IBGE, 2011).

A eficiência reprodutiva é um dos principais fatores que contribuem para melhorar o retorno econômico de uma criação de gado de corte, haja vista que a taxa de parição e a distribuição desses partos tem um importante impacto sob o planejamento e economia de uma propriedade (BÓ, 2006). Sendo assim, em um rebanho de vacas de corte para obter-se a máxima eficiência reprodutiva é necessário que todos os aspectos fisiológicos, nutricionais e de manejo estejam perfeitamente integrados e em pleno funcionamento (GREGORY et al., 2009).

A utilização de tecnologias reprodutivas, como a inseminação artificial, traz um importante acréscimo no avanço genético do rebanho de corte criado em sistema extensivo (CORBET et al., 1999). Quando associada a terapias hormonais para sincronizar e induzir estros, mesmo em vacas acíclicas, tem-se a inseminação artificial em tempo fixo, a qual constitui uma técnica que contribui para otimizar a utilização do tempo, mão de obra por encurtar o intervalo entre partos, proporcionando aumento de peso e da uniformidade dos produtos (BÓ, 2006; GREGORY, 2002).

Entretanto, outras biotecnologias como a produção *in vitro* de embriões têm sido utilizadas para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir o descarte precoce das fêmeas com alto índice zootécnico, sejam as que foram submetidas a aspiração folicular *in vivo* ou as fêmeas que possuem alterações adquiridas que impeçam a reprodução natural. Além disso, a produção *in vitro* de embriões permite o aprofundamento dos conhecimentos relacionados aos processos fisiológicos, bioquímicos, biotecnológicos da espécie em estudo, sem a necessidade da utilização de animais de laboratório (GONÇALVES et al., 2008).

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) é considerado um dos mais importantes sistemas regulatórios para a homeostase cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrólítico (SANTOS et al., 2000). Este sistema tem influência sobre as mais variadas funções orgânicas, envolvendo múltiplos mediadores de respostas biológicas, receptores e mecanismos de sinalização intracelular variados. Dessa forma, os componentes do SRA já foram encontrados em tecidos como coração, cérebro, rins, glândulas adrenais, vasos

sanguíneos e órgãos reprodutores, permitindo distinguir um SRA local e um circulante (YOSHIMURA et al., 1996). Entre estes órgãos, estão os ovários (COSTA et al., 2003).

Pesquisas mostraram que a angiotensina II (Ang-II) possui uma grande importância nos processos de maturação do oócito e ovulação (YOSHIMURA et al., 1996) e sua relação com a ovulação foi confirmada após o bloqueio dos receptores da Ang II por inibir completamente a ovulação em ratas impúberes mesmo esses animais sendo estimulados com gonadotrofina coriônica equina (eCG) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) (PELLICER et al., 1988). Já a enzima conversora da angiotensina (ECA) foi identificada como um dos componentes reguladores do desenvolvimento folicular e a maturação oocitária, pois está distribuída na superfície folicular do oócitos e na zona pelúcida (BRENTJENS et al., 1986). A inibição da ECA pode ser realizada através da utilização de inibidores como o enalapril, causando um bloqueio irreversível na conversão da angiotensina I em Ang-II fazendo com que os níveis plasmáticos de Ang-II fiquem diminuídos e conseqüentemente ocorra o aumento da disponibilidade da angiotensina-(1-7) (TAVARES et al., 2015; BROSNIHAN et al., 1999).

Nos estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa o enalapril, inibidor da ECA, foi utilizado com a finalidade de verificar sua ação no ovário de diferentes espécies como ratos, coelhos, ovelhas, cabras (Costa et al., 2003; Viana et al., 2011; Pereira et al., 2015; Costa et al., 2014; Fernandes Neto, et al., 2018), também foi observado aumento no número de embriões caprinos transferíveis e melhora de sua qualidade, além do aumento no número de gestações e produtos nascidos por transferência de embriões (Oliveira, 2003; Feitosa, 2010). Diante disso, objetivo do trabalho foi estudar alternativas complexação do Enalapril com outras substâncias, visando sua aplicabilidade prática nos protocolos de biotecnologia da reprodução em animais, além de verificar os efeitos do enalaprilato e A-779 na maturação oocitária, fertilização e cultivo de embriões in vitro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo Estral

Após atingir a puberdade a fêmea bovina inicia o período reprodutivo cíclico, o qual continua durante toda a vida reprodutiva do animal, a não ser que ocorra uma prenhez ou anestro induzido por um período de balanço energético negativo (DISKIN et al., 2003). Portanto, ciclo estral é uma sequência de eventos endócrinos, morfológicos e comportamentais iniciando no estro e terminando no estro subsequente. Os ciclos são

caracterizados pelo crescimento e regressão de folículos e corpo lúteo, com duração média de 21 dias, além disso, as vacas são consideradas poliéstricas, pois apresentam ciclos durante todo o ano (GONZÁLEZ, 2002; SARTORI et al., 2011).

Alguns milhares de folículos estão presentes em cada um dos ovários da vaca, mas apenas um deles ovula em um ciclo estral. Observações ultrassonográficas têm revelado que o desenvolvimento e regressão dos folículos ovarianos durante o ciclo estral ocorre em padrão de ondas, variando de duas a quatro ondas por ciclo em vacas *Bos taurus* e de duas a três em vacas Nelore, com o crescimento de um folículo dominante e atresia dos demais (BÓ, 2000; HAFEZ; HAFEZ, 2004; SARTORI et al., 2011).

Existem diferenças relacionadas a emergência de folículos antrais, em vacas Nelore há emergência de um grande número de folículos antrais durante a primeira onda. Buratini et al. (2000) encontraram aproximadamente 50 folículos pequenos nos ovários de novilhas Nelore, enquanto em animais de raças europeias foram encontrados aproximadamente 24 folículos antrais pequenos (3-5mm). Outra diferença marcante está no diâmetro máximo do folículo dominante, em vacas Nelore o diâmetro pode chegar entre 10-12 mm, enquanto em vacas da raça Holandesa podem alcançar 16-20 mm (SARTORI et al., 2011).

De cada onda de crescimento folicular, um único folículo “dominante” continua a crescer, enquanto suprime o crescimento dos folículos maiores que quatro milímetros. O crescimento de folículos com diâmetro superiores a 4 mm depende do hormônio folículo estimulante (FSH), mas os folículos antrais maiores transferem suas necessidades gonadotróficas para o hormônio luteinizante (LH) (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O FSH permite que os folículos mantenham seu crescimento e proliferação celular, aumentando gradualmente sua capacidade esteroidogênica. O folículo ovulatório é formado a partir da última onda folicular do ciclo estral, sendo que folículos dominantes de ondas anteriores entram em processo de atresia. Esta atresia é determinada pela presença de um corpo lúteo ativo no ovário, com ampla produção de progesterona. Este hormônio exerce um efeito de retroalimentação negativa no eixo sistema nervoso central (hipotálamo/hipófise/ovário), reduzindo a amplitude e frequência dos pulsos do LH, o que inviabiliza os processos de maturação final do folículo e ovulação. Já o folículo dominante em ambiente com baixa concentração de progesterona promove o aumento das concentrações de estrógenos, que desencadeia o mecanismo de retroalimentação positiva para a secreção do hormônio liberador da gonadotrofina (GnRH) e o consequente pico de LH, promovendo a ovulação (GREGORY, 2009).

2.2 Sistema Renina Angiotensina (SRA)

O sistema renina angiotensina tem como função primária promover a homeostase cardiovascular e o equilíbrio hidroeletrólítico (SANTOS et al, 2000). No entanto, o SRA possui componentes em outros órgãos, como: coração, glândulas salivares, cérebro, testículo, útero e o ovário (RAPOSO-COSTA; REIS, 2000).

Este sistema apresenta componentes básicos como a renina, angiotensinogênio, angiotensina-I (Ang-I), enzima conversora da angiotensina (ECA) e angiotensina-II (Ang-II). A renina é a enzima responsável por realizar a conversão proteolítica do angiotensinogênio em angiotensina-I. A ECA tem como função converter a Ang-I em Ang-II, através da clivagem de dois aminoácidos carboxi-terminais, sendo a Ang-II o principal peptídeo do sistema renina angiotensina. Existem outros peptídeos presentes no SRA cuja as funções ainda não foram elucidadas, porém foram relatadas, conforme figura 1: angiotensina III, angiotensina IV, angiotensina-(1-9), angiotensina-(1-7), angiotensina-(1-5), outra enzima conversora de angiotensina a ECA2 (BURRELL et al., 2004; DONOGHUE et al., 2000) e a ECA3 (RELLA et al., 2007).

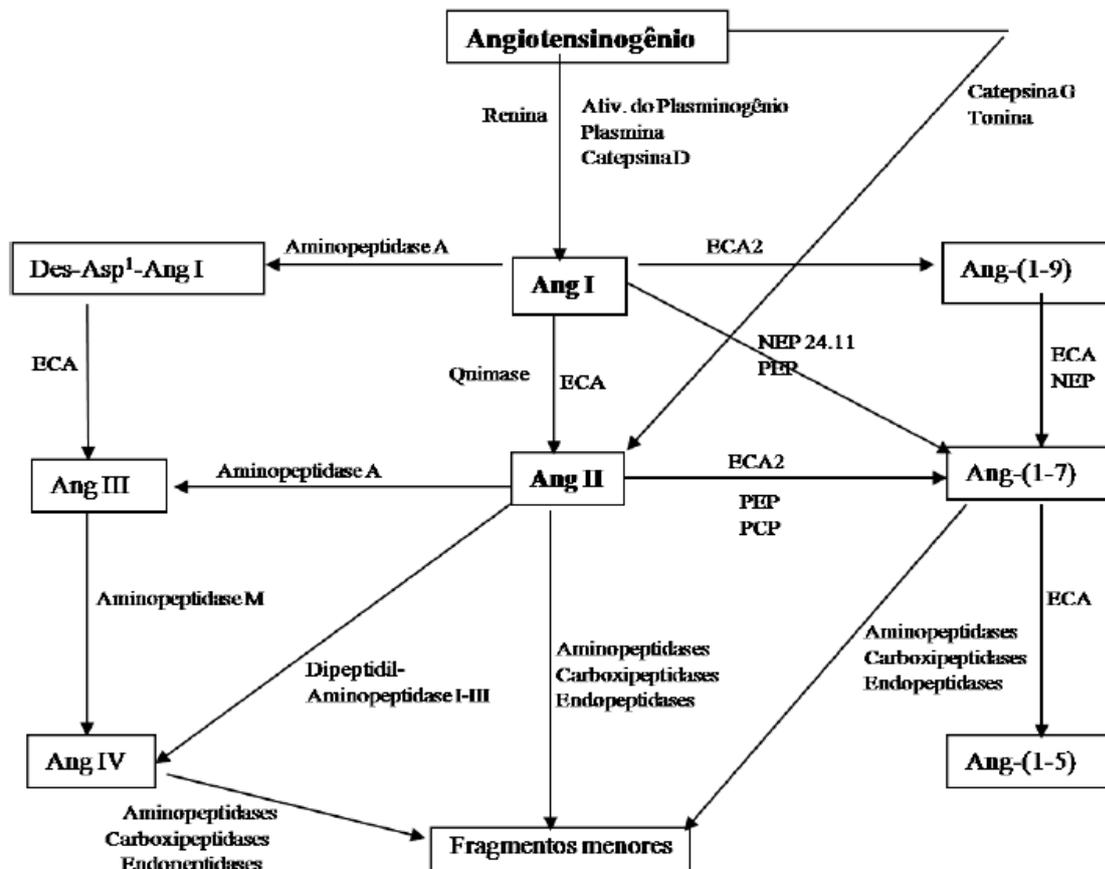


Figura 1: Esquema geral do sistema renina angiotensina (Fonte: Raposo Costa; Reis, 2000)

2.3 Sistema Renina Angiotensina Ovariano

Os componentes do SRA também podem ser identificados no sistema reprodutivo de machos (célula de Leyding e células espermáticas) e fêmeas (oócitos e células da granulosa) (GONÇALVES et al., 2012; SPETH et al., 1999), existem evidências que reforçam a presença do SRA ovariano como: a concentração de Ang-II no fluido folicular de ratas após o tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG), e a presença de elevados níveis de Ang-II no fluido folicular após a nefrectomia bilateral (HUSAIN et al., 1987), além da produção de Ang-II nos ovários de coelha expostos in vitro ao hCG (YOSHIMURA et al., 1994).

As vias que compõem os eventos reprodutivos do SRA estão bem elucidadas, na qual a ECA1, principal enzima do SRA, converte a Ang-I em Ang-II, a qual participa da fisiologia reprodutiva da fêmea através do receptor tipo I da Ang-II (AT₁) e receptor tipo II da Ang-II (AT₂), já no sistema reprodutivo do macho a Ang-II atua somente com o AT₁. A ECA2 também pode ser considerada um fator regulador da fisiologia reprodutiva

de machos e fêmeas através da angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)), a qual é formada a partir da Ang-II através da clivagem pela ECA2, tendo como atuação na reprodução o receptor MAS. Os receptores atuam em diferentes locais dos órgãos reprodutivos, na fêmea os receptores AT1, AT2 e MAS possui afinidade pelos folículos em desenvolvimento, células da granulosa, células em apoptose e ovulação, já nos machos os receptores AT1 e MAS atuam particularmente na esteroidogênese, contratilidade do epidídimo e nas funções da célula espermáticas (GONÇALVES et al., 2012; FERREIRA et al., 2011; LEUNG et al., 2003; REIS et al., 2010;). (Figura 2).

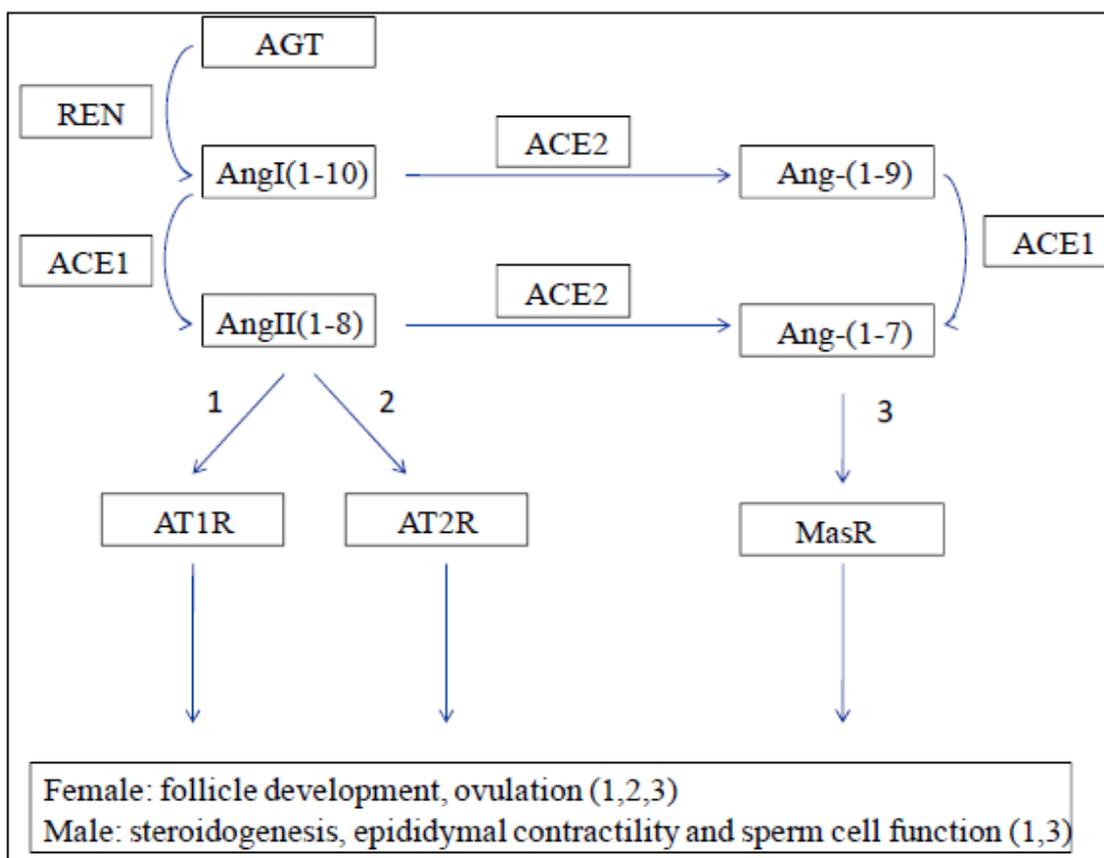


Figura 2: Esquema das vias de atuação do sistema renina angiotensina no ovário e no testículo (Fonte: PAN et al., 2013).

2.4 Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECAs)

Os inibidores da ECA constituem-se em uma classe de fármacos conhecidos para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica, como exemplo têm-se o captopril, enalapril e o ramipiril. Estes fármacos se ligam ao sítio catalítico da ECA, causando um bloqueio reversível na conversão de angiotensina I em angiotensina II (TAVARES et al., 2015). O bloqueio da ECA atua com efeito hipotensor causado pela inibição dos efeitos vasoconstritores e estimulantes da secreção de aldosterona da Ang-II e, indiretamente,

previnem a doença isquêmica cardíaca, doença aterosclerótica, nefropatia diabética e hipertrofia vascular esquerda (PEREIRA, 1999).

O captopril foi o primeiro inibidor da ECA ativo por via oral, com início de ação rápido e apresenta curta duração. Compostos de ação mais prolongada foram desenvolvidos, como enalapril, que sofre transformação metabólica no fígado e parede intestinal, como os demais inibidores da ECA, exceto o captopril e lisinopril. Com relação à redução da pressão arterial os efeitos são semelhantes entre vários IECAs, entretanto existem diferenças na absorção, meia-vida e ligação com proteínas. As vias de eliminação dos IECAs são quase exclusivamente por via renal, exceto em relação aotrandolapril e fosinopril, os quais possuem eliminação hepática. Os IECAs também apresentam propriedades lipossolúveis, como é o caso do quinapril e o ramipril, altamente lipofílicos, ligando-se a ECA tissular por período de tempo mais prolongado, e atribui-se uma característica com efeito favorável no controle da pressão arterial por aumento de substâncias vasodilatadoras (bradicinina e prostaglandina) e diminuição da Ang-II (RIBEIRO, 2002, RIBEIRO et al., 2007).

A captopril apresenta uma molécula com radical sulfidril, conferindo a propriedade de impedir a progressão da vasculopatia diabética. Já o lisinopril é desprovido deste radical, promovendo uma redução da proteinúria em pacientes com doença renal (ZANELLA et al., 2002).

O enalapril, apresenta em sua estrutura química uma dicarboxila, derivado de dois aminoácidos, a L-alanina e a L-prolina, é um monoéster, precisando ser hidrolisado antes da absorção formando um metabólito ativo, o enalaprilato (THONGNOPNUA, POEAKNAPO, 2005). Além disso, o enalapril apresenta baixa solubilidade em água, mas alta solubilidade em metanol, dessa forma torna-se interessante utilizar o enalapril com um conjugado de ciclodextrina, composto que apresenta grupos hidroxila em sua estrutura (ALI; MAHESHWARI; ASMAT, 2006).

2.4.1 Ação dos inibidores da ECA no trato reprodutivo

O uso do captopril associado com ácido acetilsalicílico aumentou o fluxo sanguíneo ovariano e uterino de éguas cíclicas, promovendo dessa forma um maior fluxo de nutrientes, hormônios e estimulantes de crescimento endócrinos (BOLLWEIN et al., 2004). Entretanto, os inibidores da ECA (captopril, lisinopril e enalapril) não inibem a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), sugerindo que a ECA2 possa atuar contra-regulando a atividade dos componentes vasoconstritores do SRA, além da possível

contribuição da Ang-(1-7) e ECA2 para a regulação cardiovascular durante a gestação (BROSNIHAN et al., 2004).

Com relação a inibição da produção de Ang-II utilizando o captopril, esta não afetou a ovulação em ratos estimulados com eCG/hCG ou em ovários perfundidos (DAUD et al., 1990; PETERSON et al., 1993; YOSHIMURA et al., 1994), sugerindo que a Ang-II produzida localmente não é crítica para o processo de ovulação (PEREIRA et al., 2015). O mecanismo de ação inclui a geração de outros fragmentos de angiotensina sem participação da ECA, por exemplo, a Ang-(1-7) pode ser formada por vias independentes da ECA, como ocorre na conversão direta de Ang-II para Ang-(1-7) pela via da ECA2, além de outras enzimas como endopeptidase neutra (NEP) e prolil-endopeptidase (PEP) que convertem a Ang-I em Ang-(1-7) (SANTOS et al., 2013).

Estudos realizados utilizando o enalapril como inibidor da ECA não obtiveram efeitos sobre a ovulação em ovelhas submetidas a protocolo de sincronização do estro e ovulação para inseminação artificial e superovulação (COSTA et al., 2014; PEREIRA et al., 2015), quando comparados com os modelos (DAUD et al., 1990; PETERSON et al., 1993; YOSHIMURA et al., 1994) que utilizaram o captopril. Essa ausência de efeito dos inibidores da ECA sobre a ovulação pode ser atribuído a um aumento de Ang-(1-7) possivelmente induzido pela gonadotrofinas, por exemplo, a administração de GnRH em vacas que elevou a concentração de Ang-(1-7) no fluido folicular (TONELLOTO dos SANTOS et al., 2011). Além disso, o uso de gonadotrofinas exógenas também pode estimular importantes fatores parácrinos relacionado ao processo ovulatório como os membros da família do fator de crescimento epidérmico (EFG) (ASHKENAZI et al., 2005; CONTI et al., 2006) e prostaglandinas (RICHARDS et al., 2002a), podendo encobrir os efeitos dos inibidores da ECA na ovulação.

2.5 Função ovariana e esteroidogênese

Os efeitos do captopril sobre a esteroidogênese ovariana em doadoras de óvulos in vivo mostraram um aumento nos níveis de estradiol e uma diminuição dos níveis de progesterona (MORRIS et al., 1995). Em um modelo semelhante de células GL humanas cultivadas, foi demonstrado que a Ang-II regula a síntese de progesterona nestas células, dessa forma modula a atividade de 3β -hidroesteróide desidrogenase (RAINEY et al., 1993). O efeito da Ang-II variou durante o período de cultura, sugerindo que a resposta celular a Ang-II pode depender da fase de diferenciação e explicar os resultados contraditórios apresentados por outros pesquisadores (PALUMBO et al., 2016).

Com relação ao enalapril, Pereira et al. (2015), demonstraram que a inibição da ECA ao longo de um protocolo de superovulação em ovinos, diminui a produção de estradiol, enquanto que Costa et al. (2014), utilizaram o enalapril em um protocolo de sincronização do estro em ovinos e neste houve um aumento da produção de estradiol. A diferença na resposta esteroidogênica a inibição da ECA pode ser devida à administração concomitante de enalapril e progestina, a qual é utilizada para inibir o aumento de GnRH em ambos os protocolos. Na sincronização do estro, o enalapril foi aplicado após a remoção da fonte de progestina, enquanto no protocolo de superovulação a inibição da ECA ocorreu ao longo do protocolo. Considerando estes fatos para um protocolo de superovulação preconiza-se a aplicação do inibidor da ECA após a retirada da fonte de progesterona (PEREIRA et al., 2015).

2.6 Produção in vitro de embriões (PIV)

A produção in vitro de embriões vem se estabelecendo com uma importante biotécnica de reprodução assistida empregada no melhoramento genético de rebanhos de interesse econômico, com a finalidade de acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir o descarte precoce de fêmeas portadoras de alterações adquiridas que impeçam de reproduzir pela forma natural ou via transferência de embriões. Além disso, a PIV também é considerada uma excelente ferramenta para pesquisa de fenômenos biológicos que ocorrem durante a maturação, fecundação e cultivo in vitro de oócitos, capacitação espermática e eventos relacionados ao início do desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação (GONÇALVES et al., 2007).

Existem diversas vantagens e aplicações relacionadas a utilização da PIV dentre elas estão: determinação e controle do sexo dos produtos; aumento da eficiência dos programas núcleos de produção; rápidas e melhores possibilidades para executar programas de cruzamento; estimação do efeito materno sobre a descendência; rápida multiplicação de raças; facilidade de importação e exportação de material genético da fêmea; formação de bancos de gametas congelados; aumento da eficiência do sêmen congelado de alto valor genético e estudo e desenvolvimento de outras biotecnias reprodutivas a partir da micromanipulação de gametas e embriões (GONÇALVES et al., 2008).

O processo de produção de embriões in vitro envolve as etapas de coleta de oócitos, maturação in vitro (MIV), fecundação in vitro (FIV) e o cultivo ou co-cultivo in vitro (CIV) de zigotos e embriões fora do útero animal (GONÇALVES et al., 2008).

A coleta de oócitos para a PIV pode ser realizada através de diversas técnicas, sendo post mortem, a partir da punção folicular oriundo de ovários obtidos de abatedouro, ou in vivo por meio da laparotomia ou laparoscopia via flanco, e ainda por laparoscopia vaginal ou pela técnica da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom *Ovum Pick Up* (OPU) (VARAGO et al., 2008). A obtenção de oócitos a partir de ovários oriundos de abatedouros é uma ferramenta de grande importância para a pesquisa. Existem metodologias para a recuperação destes oócitos como a aspiração folicular com agulha hipodérmica acoplada a seringa ou a bomba de vácuo proporcionam número suficiente de oócitos com boa morfologia para a realização de testes in vitro (GONÇALVES et al., 2007).

Por outro lado, a OPU apresenta uma maior flexibilidade, pois permite a obtenção de oócitos de fêmeas a partir dos 6 meses de idade, vacas prenhes até o terceiro mês de gestação ou mesmo após o parto. A eficiência da aspiração folicular transvaginal está relacionada a técnica utilizada, a qual interfere na quantidade e morfologia dos complexos cúmulus oócitos (CCOs) e conseqüentemente na competência para o desenvolvimento embrionário (BOLS et al., 1997). Como exemplo disso temos o estudo de Gibbons et al., (1994), que realizando aspiração folicular duas vezes por semana produz uma maior percentagem de embriões grau 1 e um maior número de embriões transferíveis do que aspirações realizadas uma vez por semana.

2.6.1 Maturação in vitro (MIV)

Durante o desenvolvimento folicular os oócitos sofrem várias alterações de ordem estrutural, do citoesqueleto e bioquímicas. As modificações que se iniciam com a formação do folículo primordial e continuam até o momento da ovulação, tornam o oócito apto para a fecundação e desenvolvimento embrionário. Portanto, os oócitos oriundos de folículos grandes possuem maior competência para o desenvolvimento embrionário do que oócitos derivados de folículos pequenos, pois estes permaneceram mais tempo no ambiente folicular sofrendo os efeitos da interação com a célula da granulosa, devido aos mecanismos de sinalização coordenados por fatores autócrinos e parácrinos e funcionalidades das junções *Gap* (ROSA, 2016).

Folículos em crescimento e dominantes possuem oócitos bloqueados durante o estágio de diplóteno da prófase meiótica. In vivo, a retomada da meiose é iniciada por uma onda pré-ovulatória de LH e ocorre somente em oócitos de folículos dominantes, completamente crescidos e aptos para a meiose (VAN DER HURK E ZHAO, 2003).

O oócito é circundado por uma camada compacta de células da granulosa formando o complexo *cumulus*-oócito, antes e durante o período da onda de LH. Nas células mais internas do *cumulus*, várias projeções penetram na zona pelúcida e atingem o oolema com junções *Gap* (RICHARDS et al., 2002b). Substâncias reguladoras produzidas pelo oócito apresentam função importante na atividade das células do *cumulus*, assim como, os componentes das células somáticas têm participação ativa no mecanismo de crescimento e maturação dos oócitos. A maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário, apresentaram melhores resultados na presença das células do *cumulus*, fato que evidencia a importância dessas células na maturação do oócito *in vitro* (GONÇALVES et al., 2008).

Durante a maturação molecular do oócito acontece a síntese de RNAm materno e importantes proteínas para o desenvolvimento embrionário precoce (SIRARD, 2001). Franciosi et al. (2016), demonstraram em roedores que a capacidade de tradução e acúmulo de proteínas pelo oócito é dependente da ação do FSH, que por intermédio da ação do sistema EGF nas células somáticas do folículo, determinaram a ativação da via PI3K/AKT no interior do oócito.

Os fatores relacionados com a ativação do MPF (fator promotor da maturação) e a MAPK (proteína cinase ativadora do mitogênio) são provavelmente o pico de LH ou a retirada do oócito. O MPF e a MAPK são responsáveis pelo início da maturação do oócito, formação dos fusos meióticos e manutenção do segundo bloqueio meiótico na fase de metáfase II. Com o fechamento das junções *gap* e a diminuição nos níveis de GMPC (Guanosina Monofosfatase Cíclica) o processo de reinício da meiose ocorre no interior do oócito. Esses eventos desencadeiam a ativação da enzima Fosfodiesterase 3 (PDE3A) a qual atua degradando o AMPc (Adenosina Monofosfatase Cíclica), levando subsequentemente a diminuição nos níveis do AMPc determinando a ocorrência do rompimento da vesícula germinativa pela via de desfosforilação da proteína CDK1 e ativação do MPF. O rompimento da vesícula germinativa é seguida pela organização do material genético até atingir a metáfase II, relacionado a ativação da MAPK no interior do oócito. O acionamento da MAPK é desencadeado pela fosforilação de resíduos de tirosina e treonina fundamental para a progressão da meiose de oócitos de diferentes espécies passando pelos estádios de metáfase I, anáfase I, telófase I e progredindo até a metáfase II, levando a segunda parada meiose (ROSA, 2016).

O processo de maturação também depende da participação de fatores autócrinos e parácrinos produzidos e secretados pelas células que compõem o ambiente folicular,

atuando isoladamente ou em associação com hormônios. Para os sistemas de maturação da PIV em bovinos diferentes meios vem sendo estudados e testados para esta fase, tais como Synthetic Oviductal Fluid - SOF, Ham's F-12 e o Tissue Culture Medium 199 (TCM 199®). Sendo o último o mais difundido entre os laboratórios de PIV, o qual é geralmente suplementado com soro fetal bovino (SFB), aminoácidos como L-glutamina, bicarbonato de sódio, FSH, LH, estradiol-17 β , piruvato de sódio, lactato, vitaminas e antibióticos (GANDHI et al., 2000; SMETANINA et al., 2000). Além disso, também se torna necessária a utilização de uma estufa que mantenha uma atmosfera gasosa e temperatura controlada e adequada, sendo que o período de maturação varia de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

2.6.2 Fecundação in vitro (FIV)

O processo de fecundação ocorre quando o espermatozoide entra em contato com o oócito gerando o zigoto, que posteriormente se desenvolve até o estágio de blastocisto. Durante o processo in vivo, os espermatozoides precisam chegar até a ampola da tuba uterina para fecundar o oócito, e que durante esse trajeto, substâncias presentes no sistema reprodutor da fêmea induzem a capacitação dos espermatozoides, onde se observam modificações bioquímicas, tais como alterações na fluidez e no teor lipídico da membrana plasmática, resultando em uma hiperativação espermática. Desse modo, esse processo torna possível a ligação da membrana do espermatozoide a receptores específicos na zona pelúcida do oócito, onde ocorre a reação acrossômica (MELLO et al., 2016). Já para o processo in vitro deve-se fornecer um ambiente adequado através da utilização de meios de fecundação in vitro. O meio mais utilizado é FERT-TALP, possuindo em sua constituição fatores capazes de promover a capacitação espermática como é o caso da heparina, além de, outros fatores que são importantes para a motilidade e suporte do gameta masculino como a epinefrina, hipotaurina e penicilamina também estão presentes no meio (IRITANI; NIWA, 1977). Os espermatozoides viáveis contidos em uma palheta de sêmen precisam ser separados do plasma seminal, crioprotetores, extensores e dos espermatozoides mortos antes de serem co-cultivados com os oócitos. Para bovinos, os métodos de separação espermática mais utilizados são o gradiente de PERCOLL e o swim-up. Após a separação, os espermatozoides são diluídos a uma concentração final de 1 a 5 x 10⁶ espermatozoides viáveis/ml de meio. O co-cultivo (espermatozoide e oócito)

é realizado por um período de 18 a 22 horas, em temperatura de 39°C e atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007).

2.6.3 Cultivo in vitro (CIV)

A etapa do cultivo inicia-se após as etapas de maturação e fecundação, com a formação do zigoto que deverá passar por inúmeras divisões celulares ou clivagens até se constituir em blastocisto. Todavia, existe um momento crítico para o desenvolvimento embrionário posterior, o qual inicia-se logo após a fecundação, quando o cromossomo feminino reinicia a segunda meiose para formar o pró-núcleo feminino. Isso se deve ao fato do embrião em sua fase inicial de desenvolvimento ser dependente do material genético materno acumulado durante a maturação citoplasmática, a duração dessa fase vai até a ativação do genoma embrionário, nos bovinos ocorre no estágio de 8 a 16 células, esse processo é conhecido como transição materno-zigótica (BLONDIN; SIRARD, 1995; BREVINI-GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; CAMARGO et al., 2001; MINAMI, 1996).

Novos sistemas de cultivo foram sendo criados e estudados para permitirem o desenvolvimento embrionário in vitro, a partir de meios como o *Whitten* e o *Brinster Medium for Ovum Culture* (BMOC), e da utilização do co-cultivo de embriões com diversos tipos de células, como células epiteliais do oviduto bovino, células da granulosa, vesículas trofoblásticas, células VERO (linhagens celulares estabelecidas para cultivo), células BRL (buffalo rat liver), células endometriais, ou do cultivo em meio condicionado por vários outros tipos celulares (BUENO; BELTRAN, 2008; GONÇALVES et al., 2007).

A utilização das células somáticas aos sistemas de cultivo está relacionada a produção de fatores de crescimento, como IGF-1, EGF e TGFβ₁, que atuam na proliferação de células sendo importantes para a remoção de componentes inibitórios do ambiente de cultivo, que poderiam ser prejudiciais ao embrião. No entanto, existem atualmente sistemas mais simples que vem substituindo o uso de células somáticas, tais como: Charles Rosenkrans (CR-1, CR-2), Synthetic Oviductal Fluid (SOF) e meio simples de potássio otimizado (KSOM) acrescido de aminoácidos e associado a uma atmosfera gasosa controlada contendo 5% de O₂ (BUENO; BELTRAN, 2008; CAMARGO et al., 2001; LONERGAN et al., 1996; MATSUI et al., 1997).

A fase de cultivo in vitro também requer um ambiente adequado com tempo, atmosfera e temperatura controlados, sendo assim o tempo de cultivo varia de 7 a 9 dias sendo a taxa de blastocisto avaliada no dia 7 e a verificação de blastocisto eclodido no dia

9, em temperatura de 39°C com atmosfera controlada (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do trabalho foi estudar alternativas complexação do enalapril com outras substâncias, visando sua aplicabilidade prática nos protocolos de biotecnologia da reprodução em animais, além de verificar os efeitos do enalaprilato e do A-779 na maturação oocitária, fertilização e cultivo de embriões in vitro bovinos.

3.2 Objetivos Específicos

Determinar a dose efetiva de enalapril, bem como a eficácia de sua administração por via intravaginal em bovinos.

Estudar os efeitos do enalaprilato e do A-779 na maturação folicular, fertilização e cultivo in vitro de embriões bovinos, visando sua aplicabilidade em protocolos de produção de embriões in vitro.

4 ESTRUTURA DA TESE

Esta tese apresenta a seguinte estrutura formal: Uma introdução, revisão de literatura, Capítulo I, II e III contendo os artigos intitulado “Avaliação da dose efetiva do gel de enalapril em bovinos”, a ser encaminhado para publicação no periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, “Enalaprilato na produção in vitro de embriões bovinos” e “Influência do enalaprilato e A-779 na produção in vitro de embriões bovinos”, a serem encaminhados para publicação no periódico *Reproduction in Domestic Animals*. Os artigos foram estruturados de acordo com as normas técnicas dos periódicos citados.

5 CAPÍTULO 1

Avaliação da dose efetiva do gel de enalapril em bovinos
Evaluation of the effective dose of enalapril gel in cattle

(De acordo com as instruções da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia)

Avaliação da dose efetiva do gel de enalapril em bovinos

Evaluation of the effective dose of enalapril gel in cattle

D. Kunkel¹

¹ Doutoranda em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.
danikunkel@hotmail.com

Resumo

O objetivo do estudo foi encontrar a dose de enalapril adequada para utilização em fêmeas bovinas por via intravaginal na forma de gel, a fim de ser utilizado em um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo. Foi desenvolvido um gel de enalapril utilizando o polaxamer 407 como um dos excipientes. Para o experimento foram selecionadas 6 fêmeas bovinas não gestantes da raça Girolanda. Os animais foram inicialmente submetidos a uma avaliação clínica, mensuração da pressão arterial sistólica e diastólica para a obtenção da pressão arterial média (PAM). Todos os animais receberam as três diferentes doses por via intravaginal, conforme segue: 0,4 mg/kg, 0,6 mg/kg e 0,8 mg/kg de peso vivo, multiplicadas por 3, que corresponde aos 3 dias de permanência do gel intravaginal no trato reprodutivo. A mensuração da pressão foi realizada durante os três dias nos seguintes horários: 07:30, 10:30, 13:30 e 16:00. Para a mensuração foi utilizado um esfigmomanômetro digital automático para uso veterinário (CONTEC08A-VET[®], Contec Medical Systems, China). Amostras de sangue foram coletadas uma vez ao dia, 24h após a primeira e a última aplicação do tratamento, para avaliação da toxicidade hepática, renal e dosagem de aldosterona. O delineamento inteiramente casualizado foi utilizado, sendo que todos os animais passaram pelos três tratamentos (delineamento “*cross-over*”), em um total de 36 repetições por tratamento. A análise estatística foi realizada através da ANOVA, utilizando o teste Student-Newman-Keuls Method para a comparação de média. O software que utilizado para a análise dos dados foi o SigmaStat[®] versão 3.5. Os resultados para o efeito da dose do gel de enalapril não apresentou diferença significativa, onde o controle (dose 0) foi de $83,08 \pm 2,88$ mmHg, sendo similar aos tratamentos com doses 0,4, 0,6 e 0,8 mg/kg ($83,61 \pm 1,30$; $84,84 \pm 1,30$ e $82,63 \pm 1,30$ mmHg, respectivamente), também não houve diferença significativa quanto efeito residual do gel de enalapril sendo de $84,80 \pm 1,4$ mmHg no primeiro horário de observação e de $82,89 \pm 1,3$ para o último horário, assim como não houve diferença significativa para os níveis de uréia, creatinina, TGO, TGP e aldosterona. Conclui-se que não houve efeito do gel de enalapril nas doses de 0,4, 0,6 e 0,8 mg/kg quando aplicados por via intravaginal, necessitando novas formulações farmacêuticas que propiciem adequada liberação e absorção por via vaginal.

Palavras chave: inibidor da ECA; IATF; produto farmacêutico.

Abstract

The aim of the study was to find the appropriate enalapril dose for use in bovine females intravaginally in the form of a gel, in order to be used in a fixed-time artificial insemination protocol. An enalapril gel was developed using polaxamer 407 as one of the excipients. For the experiment, 6 non-pregnant Girolanda bovine females were selected. The animals were initially submitted to a clinical evaluation, measurement of systolic and diastolic blood pressure to obtain the mean arterial pressure (MAP). All animals received the three different doses intravaginally, as follows: 0.4 mg/kg, 0.6 mg/kg and 0.8 mg/kg

of body weight, multiplied by 3, which corresponds to the 3 days of permanence of intravaginal gel in the reproductive tract. Pressure measurement was performed during the three days at the following times: 07:30, 10:30, 13:30 and 16:00. An automatic digital sphygmomanometer for veterinary use (CONTEC08A-VET®, Contec Medical Systems, China) was used for measurement. Blood samples were collected once a day, 24 hours after the first and last application of treatment, to assess liver and kidney toxicity and aldosterone dosage. A completely randomized design was used, with all animals undergoing the three treatments (cross-over design), with a total of 36 repetitions per treatment. Statistical analysis was performed using ANOVA, using the Student-Newman-Keuls Method test for mean comparison. The software used for data analysis was SigmaStat® version 3.5. The results for the effect of the enalapril gel dose did not show significant difference, where the control (dose 0) was 83.08 ± 2.88 mmHg, being similar to the treatments with doses 0.4, 0.6 and 0.8 mg/kg (83.61 ± 1.30 ; 84.84 ± 1.30 and 82.63 ± 1.30 mmHg, respectively), and there was also no significant difference regarding the residual effect of enalapril gel, being 84.80 ± 1.4 mmHg at the first observation time and 82.89 ± 1.3 at the last time, as well as there was no significant difference for the levels of urea, creatinine, TGO, TGP and aldosterone. It is concluded that there was no effect of enalapril gel at doses of 0.4, 0.6 and 0.8 mg/kg when applied intravaginally, requiring new pharmaceutical formulations that provide adequate release and absorption via the vaginal route.

Keywords: ACE inhibitor; TAI; pharmaceutical product.

Introdução

Os protocolos de sincronização para inseminação artificial a tempo fixo (IATF) objetivam induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular, controlar a duração do crescimento folicular até o estágio pré-ovulatório, sincronizar a inserção e a retirada da fonte de progesterona exógena (implante auricular ou dispositivo intravaginal) e endógena (prostaglandina $F_{2\alpha}$) e induzir a ovulação sincronizada em todos os animais (BARUSELLI, 2004). Para obter bons resultados em um programa de IATF consideram-se as diferenças existentes na fisiologia reprodutiva das raças *Bos taurus* e *Bos indicus* como o tamanho do diâmetro folicular e a capacidade ovulatória adquirida (BÓ et al., 2003). Além disso, as vacas das raças *Bos indicus* respondem bem ao tratamento com estradiol e progesterona para sincronizar a emergência de uma nova onda folicular (MAPLETOFT, et al., 2009).

A fim de obter melhores resultados com a utilização da IATF, resolveu-se verificar a influência do sistema renina angiotensina (SRA) na capacidade ovulatória de bovinos, já que todos os componentes deste sistema podem ser encontrados em tecidos como coração, cérebro, rins, glândulas adrenais, vasos sanguíneos e órgãos reprodutores, permitindo distinguir um SRA local e um circulante. Entre estes órgãos, estão os ovários (YOSHIMURA et al., 1996; COSTA et al., 2003).

A enzima conversora de angiotensina (ECA) é o componente do SRA, responsável pela clivagem da Angiotensina I em Angiotensina II. Entretanto, existe uma classe de fármacos que promove a inibição desta enzima, eles se ligam ao sítio catalítico da ECA, causando um bloqueio reversível na conversão de angiotensina I em angiotensina II (TAVARES et al., 2015).

O enalapril, inibidor da ECA, na forma do sal pró-fármaco (maleato de enalapril), apresenta a vantagem de poder ser utilizado em apenas uma dose diária. Após administração por via oral, este sal é rapidamente absorvido e, então, hidrolisado no fígado a enalaprilato, que é um inibidor específico da ECA, de longa ação, com meia vida efetiva de 11 horas. A inibição da ECA resulta na diminuição da angiotensina II plasmática e da secreção de aldosterona (JACKSON, 2010).

Com base nesses conhecimentos, nos resultados encontrados em estudos realizados pelo nosso grupo e no fato de o inibidor da ECA aumentar a disponibilidade de Ang-(1-7), a adição do enalapril (IATF) em cabras aumentou as taxas de prenhez, parição e gemelaridade (FERNANDES NETO et al, 2018), em ovelhas produziu um aumento da concentração sérica de estradiol no período pré-ovulatório (D12) (COSTA et al., 2014). Nesses experimentos o enalapril foi utilizado em aplicações subcutâneas durante 11 e 12 dias respectivamente, com doses entre 0,2 e 0,5 mg/kg de peso corporal. Em outro estudo usando o enalapril na fórmula de óvulos vaginais (2 mg/kg) houve um aumento do percentual de inseminações intrauterinas por facilitar o relaxamento cervical (BUENO et al., 2013).

Estes resultados são muito promissores para pequenos ruminantes, entretanto, novas pesquisas são necessárias para verificar o efeito do enalapril no protocolo de IATF em bovinos. Assim como nas cabras, o tratamento durante 11 dias é muito longo para as condições de campo e faz-se necessário determinar os parâmetros terapêuticos que viabilizem a aplicabilidade prática do inibidor da ECA nas biotécnicas da reprodução, principalmente a inseminação artificial em tempo fixo.

Portanto, o trabalho teve por objetivo encontrar a dose de enalapril adequada para utilização em fêmeas bovinas por via intravaginal, a fim de viabilizar a sua utilização em um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo.

Material e Métodos

Estudo de complexação e formas farmacêuticas

Antes do início dos experimentos com animais, foram realizados estudos de complexação com outras substâncias, especialmente o polaxamer 407 (GALENA, São Paulo, Brasil), visando maior estabilidade e solubilidade, assim como absorção pela mucosa vaginal. O complexo obtido, foi submetido a estudos de pré-formulação, a uma forma farmacêutica para uso intravaginal, além disso, foi realizado um experimento piloto em modelo animal.

Para a formulação do gel de enalapril foram utilizados os excipientes polaxamer 407 (GALENA, São Paulo, Brasil), BHT, metilparabeno, propilparabeno e ácido cítrico, além de 1% (m/m) de maleato de enalapril (GALENA, São Paulo, Brasil), sendo mantido em recipiente âmbar, sob refrigeração $4^{\circ}\text{C}\pm 2$.

O procedimento para formulação do gel foi realizado inicialmente através do aquecimento da água até 70 graus, adicionando Metilparabeno e propilparabenos ("parabenos") agitando até sociabilização, posteriormente, esperou-se a água arrefecer até 30°C . Em seguida, solubilizou-se o BHT em poucas gotas de álcool PA e despejando-o na água agitando-a. Em seguida adicionou-se o polaxamer sobre a água sem agitar, observando-se uma massa de pó sobre a água, a qual foi para a geladeira a 4°C por 24h. Com gel formado e líquido o ácido cítrico foi adicionado até estabilizar o em pH 4.5.

Teste da dosagem de enalapril utilizando modelo animal

O Experimento foi realizado em Teresina (PI), no Setor de Bovinocultura do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí - UFPI. Os protocolos experimentais estão de acordo com as resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI sob o número 409/17.

Foram escolhidos para este experimento seis vacas não gestantes, da raça Girolanda, com idade entre 2-6 anos as quais recebiam pasto, concentrado e água *ad libitum*.

As fêmeas foram submetidas inicialmente a uma avaliação clínica, mensuração da pressão arterial sistólica e diastólica para obtenção da pressão arterial média (PAM). Em seguida foram aleatoriamente escolhidas para receber três diferentes doses por via intravaginal, conforme segue: 0,4 mg/kg x 3, 0,6 mg/kg x 3 e 0,8 mg/kg x 3 de peso vivo, totalizando 1,2 mg/kg, 1,8 mg/kg e 2,4 mg/kg, as quais corresponderam a três dias de doses seguindo o mesmo tempo de permanência do gel intravaginal, considerando que essa via apresenta menor taxa de absorção de medicamentos.

No experimento não há um grupo controle específico, pois este foi realizado no próprio animal que foi submetido a aplicação do enalapril, considerando que a mensuração das 07:00 h (hora zero) de cada dia foi utilizada como controle, antes da aplicação do enalapril via intravaginal. A mensuração da pressão foi realizada conforme o esquema de horários apresentados na figura 1 durante três dias. Para a mensuração foi utilizado um esfigmomanômetro digital automático para uso veterinário (CONTEC08A-VET®, Contec Medical Systems, China). Amostras de sangue foram coletadas uma vez ao dia, 24h após a primeira aplicação do tratamento, para avaliação da toxicidade hepática, renal e dosagem de aldosterona.

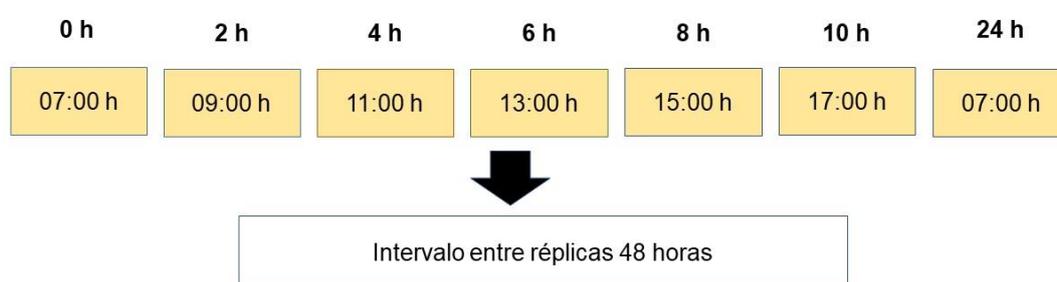


Figura 1: Esquema de horários para a mensuração da pressão arterial média.

O delineamento inteiramente casualizado foi utilizado, sendo que todos os animais passaram pelos três tratamentos (delineamento “*cross-over*”) conforme figura 2, em um total de 36 repetições por tratamento (6 animais x 6 mensurações), objetivando minimizar os efeitos individuais sobre o resultado final.

	Dia 0	Dia 5	Dia 10	Dia 15	Dia 20	Dia 25
Animal A	0,4 mg/kg	0,8 mg/kg	0,6 mg/kg	0,4 mg/kg	0,8 mg/kg	0,6 mg/kg
Animal B	0,6 mg/kg	0,4 mg/kg	0,8 mg/kg	0,6 mg/kg	0,4 mg/kg	0,8 mg/kg
Animal C	0,8 mg/kg	0,6 mg/kg	0,4 mg/kg	0,8 mg/kg	0,6 mg/kg	0,4 mg/kg
Animal D	0,4 mg/kg	0,8 mg/kg	0,6 mg/kg	0,4 mg/kg	0,8 mg/kg	0,6 mg/kg
Animal E	0,6 mg/kg	0,4 mg/kg	0,8 mg/kg	0,6 mg/kg	0,4 mg/kg	0,8 mg/kg
Animal F	0,8 mg/kg	0,6 mg/kg	0,4 mg/kg	0,8 mg/kg	0,6 mg/kg	0,4 mg/kg

Figura 2: Representação esquemática do delineamento alternado (*cross over*) durante a aplicação de enalapril por via intravaginal.

Amostras de sangue coletadas para dosagens de transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP), uréia, creatinina. O sangue foi coletado por punção da veia jugular em frascos sem anticoagulante, adicionados de ativador de coágulo (BD- Vacuette Z serumclotactivator – BD-Indústria Cirúrgica LTDA – Juiz de Fora, MG). Em seguida foi centrifugado, o sobrenadante (soro) foi guardado em microtubos com vedação hermética (tipo Eppendorf) e congelado a -20°C para posterior análise. A dosagem de aldosterona foi realizada com teste de Elisa seguindo as instruções do fabricante.

A análise estatística foi realizada através da identificação da variável dependente de distribuição normal (paramétrica) expressa em média e erro padrão da média (média \pm EPM) e analisadas por ANOVA, utilizando o teste Student-Newman-Keuls Method para as comparações de média. O software que foi utilizado para a análise dos dados foi o SigmaStat[®] versão 3.5.

Resultados e Discussão

Os resultados para as diferentes doses do gel de enalapril utilizadas neste estudo não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), sendo que a pressão arterial média dos animais aferida antes do início da administração do gel foi de $83,08 \pm 2,88$ mmHg, sendo similar aos tratamentos com doses 0,4, 0,6 e 0,8 mg/kg ($83,61 \pm 1,30$; $84,84 \pm 1,30$ e $82,63 \pm 1,30$ mmHg, respectivamente) (figura 3).

Na avaliação do efeito residual do gel de enalapril na resposta clínica dos animais não houve efeito significativo da administração sob o horário de colheita da PAM. A pressão arterial média dos animais antes e após a administração do gel de enalapril não apresentou alterações sendo de $84,80 \pm 1,4$ mmHg no primeiro horário de observação e de $82,89 \pm 1,3$ para o último horário, ($P=0,80$; Figura 4).

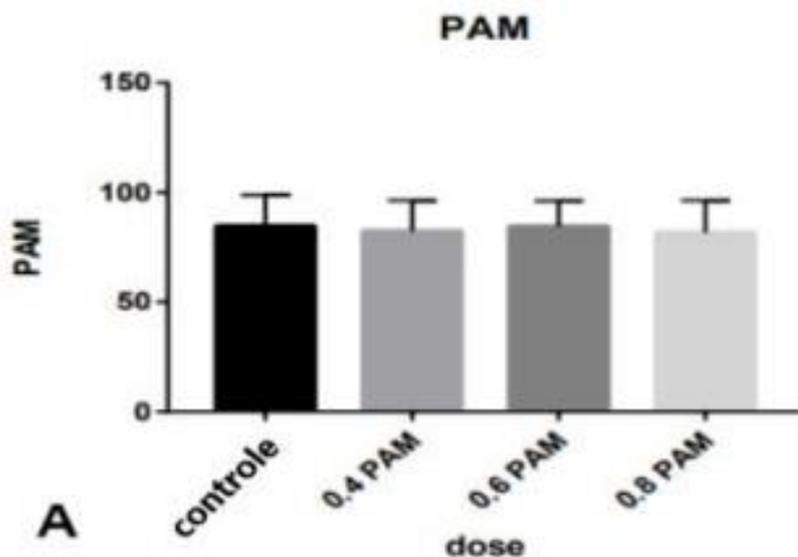


Figura 3: Pressão arterial média de fêmeas bovinas submetidas ao gel de enalapril nas concentrações de 0,4mg/kg, 0,6 mg/kg e 0,8mg/kg por via intravaginal.

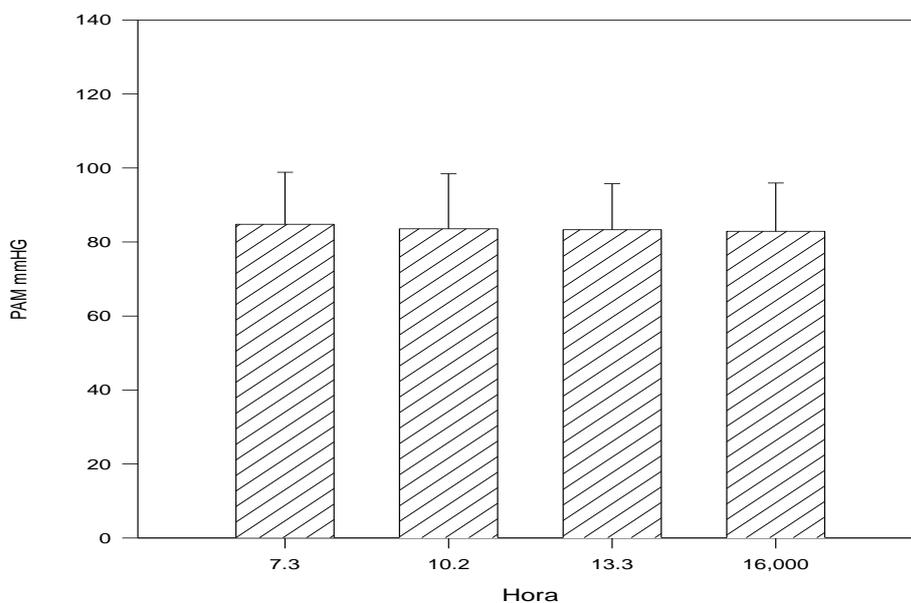


Figura 4: Avaliação da pressão arterial média (PAM) de fêmeas bovinas submetidas ao gel de enalapril por via intravaginal durante experimento piloto. $P=0,80$.

O estudo buscou demonstrar o efeito sistêmico do Maleato de Enalapril na diminuição da PAM em bovinos administrado por via intravaginal na forma de gel, entretanto os resultados encontrados não demonstraram o efeito sistêmico significativo do gel de enalapril nas doses de 0,4, 0,6 e 0,8 mg/kg. Considerando que a PAM em média em bovinos oscila entre 90 a 120 mmHg, em condições fisiológicas (LIN e WALTZ, 2014). Em nosso estudo, após serem testadas doses entre 0,4 a 0,8 mg/kg em que o gel permaneceu no trato reprodutivo por no mínimo três dias, sendo realizada somente uma aplicação, os animais apresentaram PAM em média entre 82 a 84 mmHg, demonstrando que não houve liberação do enalapril pelo gel no trato reprodutivo ou não ocorreu absorção, uma vez que a PAM manteve-se estável durante os 3 dias na média de 80 mmHg em todos os tratamentos.

O efeito sistêmico do maleato de enalapril na diminuição da pressão arterial média em bovinos administrado por via subcutânea foi demonstrado primeiramente por Barros, (2015), o qual observou efeito clínico significativo utilizando a dose de 0,4 mg/kg onde houve redução da PAM sem causar supressão cardiocirculatória excessiva, consolidando as informações obtidas em outras espécies, tais como: cães (TOCCO et al., 1982), ovinos (COSTA et al., 2014) e cabras (FERNANDES NETO et al., 2018).

O efeito farmacológico do enalapril pode ser suprimido devido as interferências ambientais como efeito das variações de temperatura, umidade e calor ao longo do dia levando a uma pressão arterial média mais elevada, como foi o caso de nosso estudo quando as avaliações ocorreram em horários mais quentes do dia os valores foram mais elevados. Isso pode ser explicado através da interferência do estresse térmico levando ao um aumento da secreção do hormônio cortisol (STARLING et al., 2005), provocando uma série de efeitos no metabolismo animal que alteram seu comportamento fisiológico (SILANIKOVE, 2000).

A análise de aldosterona foi realizada com a finalidade de verificar a atuação do gel de enalapril em nível sistêmico, o qual não demonstrou diferença significativa entre as concentrações estudadas, a dose 0 (controle) apresentou $111,84 \pm 50,3$ ng/dL enquanto as demais concentrações do tratamentos 0,4, 0,6 e 08 mg /kg apresentaram uma elevação nas suas taxas $139,36 \pm 59,35$ ng/dL; $124,62 \pm 49,74$ ng/dL e $124,88 \pm 41,46$ ng/dL, respectivamente; (P=0,46; Figura 5).

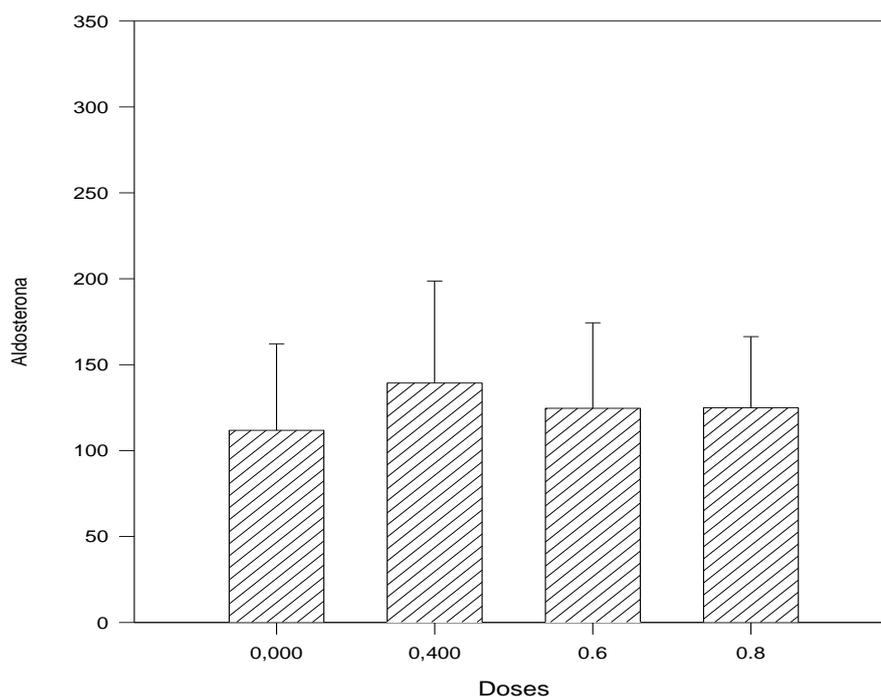


Figura 5: Níveis de aldosterona (ng/dL) em fêmeas bovinas submetidas a administração intravaginal de gel de enalapril (P=0,4)

A análise da aldosterona, demonstrou que não houve redução significativa dos níveis de aldosterona nas doses de tratamentos quando comparados ao controle. Era esperado que ocorresse a diminuição do aldosterona para comprovar o efeito sistêmico do gel de enalapril, já que a inibição da ECA resulta na diminuição da angiotensina II plasmática e da secreção de aldosterona (JACKSON, 2010).

Os inibidores da ECA atuam especificamente na enzima de conversão de angiotensina, catalisando a transformação de angiotensina I em angiotensina II, além de controlar a degradação de outros peptídeos vasoativos. Todavia, os inibidores da ECA diminuem a produção de Ang II (RIBEIRO; FLORÊNCIO, 2000), está ainda pode ser formada através de vias alternativas não dependentes da ECA, como as vias de formação de Ang II pela quimase e outras próteses que formam Ang II no miocárdio e tecido vascular (URATA et al., 1996). Fazendo com que os níveis de Ang II aumentem gradualmente apesar da manutenção da inibição da ECA (MOOSER et al., 1990). Entretanto, as concentrações de aldosterona permaneceram estáveis, indicando que não houve redução de Ang II por efeito do enalapril.

Para a avaliação da toxicidade hepática e renal foi realizada a coleta de sangue na qual realizou-se análise bioquímica demonstrando que o gel de enalapril não levou a

alterações nas taxas de ureia, creatinina, TGO e TGP (Tabela 1). Desse modo não há indícios de alterações hepáticas e renais.

Tabela 1: Análise bioquímica dos animais submetidos a aplicação do gel de enalapril por via intravaginal.

Animal	Ureia (23 - 58 mg/dL*)	Creatinina (1,0 – 2,0 mg/dL*)	TGO/ AST (0 – 132 U/L*)	TGP/ ALT (0 -38 U/L*)
A	31	1,5	73	17
B	39	1,3	57	28
C	36	1,2	81	24
D	30	1,5	71	21
E	49	1,3	47	21
F	45	1,6	57	20

*Valores normais de acordo com Kaneko et al., (1997).

Conclusão

Conclui-se que não houve efeito do gel de enalapril nas doses de 0,4, 0,6 e 0,8 mg/kg quando aplicados por via intravaginal, denotando que não houve liberação ou absorção princípio ativo.

Por se tratar de um estudo piloto são necessários a realização de mais testes de desenvolvimento de géis de enalapril a fim de verificar a eficácia da liberação e absorção do medicamento pela mucosa do trato reprodutivo, bem como aumentar a dose utilizada de maleato de enalapril na composição com a finalidade de encontrar a dose mais adequada.

Referências

BARROS, C.H.S.C. Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina na superovulação, expressão gênica folicular e produção in vivo de embriões bovinos. 2015. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Chapadinha, MA: Universidade Federal do Maranhão, 2015.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; Avanços hormonais para a inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. **Acta Scientiae Veterinariae**; v. 32 p.23-34, 2004.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p.307-326, 2003.

BUENO, M.N.; SOUSA, J. A.T.; SOUSA JUNIOR, A., Sousa, I.O.T.; Nunes, L.C.C.; COSTA, A.P.R.; SOUSA, S.R.S. Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) sobre o relaxamento da cérvix de cabras submetidas a inseminação artificial em tempo fixo In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2013, Salvador. **Anais XXVII Reunião da SBTE**. São Paulo: SBTE, 2013. p.889 – 889.

COSTA, A. P.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; PEREIRA, V. M.; SILVA, L. F.; VIEIRA, M. A.; SANTOS, R. A.; DOS REIS, A. M. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. **Endocrinology**, v.144, p.1942-1948, 2003.

COSTA, A.S.; JUNIOR, A.S.; VIANA, G.E.N.; MURATORI, M.C.S.; COSTA, A.P.R. Inhibition of angiotensin-converting enzyme increases oestradiol production in ewes submitted to oestrous synchronization protocol. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.53-55, 2014.

FERNANDES NETO, V.P.; SILVA, M.N.N.; COSTA, A.S.; KUNKEL, D.; SOUSA JÚNIOR, A.; FEITOSA, L.C.S.; MURATORI, M.C.S, COSTA, A.P.R. ACE inhibition in goats under fixed- time artificial insemination protocol increases the pregnancy rate and twin births. **Reproduction in Domestic Animals**, v.53, p.1006-1008, 2018.

JACKSON, E.K. Renina e angiotensina. In: BRUTON et al.(ed). Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Porto Alegre, AMGH Editora, 2010.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (eds.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th ed. New York: Academic Press, 1997.

LIN, H.; WALZ, P. **Farm animal anesthesia: cattle, small ruminants, camelids, and pigs**. Editora: Wiley-Blackwell, p. 296, 2014.

MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. **Animal Reproduction**, v.6, n.1, p. 114-124, 2009.

MOOSER, V.; NUSSBERGER, J.; JUILLERAT, L. Reactive hyperreninemia is a major determinant of plasma angiotensin II during ACE inhibition. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v.15, p.276-82, 1990.

RIBEIRO, J.M.; FLORÊNCIO, L.P. Bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT 1. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.3, p.293-302, 2000.

SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. **Livestock Production Science**, v.67, p.1-18, 2000.

STARLING, J.M.C.; SILVA, R.G.; NEGRÃO, J.A. Variação estacional dos hormônios tireoideanos e do cortisol em ovinos em ambiente tropical. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2064-2073, 2005.

TAVARES, M.T.; PRIMIA, M.C.; POLLIB, M. C.; FERREIRA, E. I.; PARISE-FILHO, R. Interações fármaco-receptor: aplicações de técnicas computacionais em aula prática sobre a evolução dos inibidores da enzima conversora de angiotensina. **Química Nova**, v. 38, n. 8, p. 1117-1124, 2015.

TOCCO, D.J.; LUNA, F.A.; DUNCAN, A.E. The physiological disposition and metabolism of enalapril maleat in laboratory animals. **Drug Metabolism and Disposition**, v.10, n.1, p.15, 1982.

URATA, H.; NISHIMURA, H.; GANTEN, D. Chymase-dependent angiotensin II forming system in humans. **American Journal of Hypertension**, v.9, p.277-84, 1996.

YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; AOKI, H.; ODA, T.; KOYAMA, N.; NAGAI, A.; AKIMOTO, Y.; HIRANO, H.; NAKAMURA, Y. Angiotensin II induces ovulation an oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. **Endocrinology**, v. 137, p. 1204-11, 1996.

6 CAPÍTULO 2

Enalaprilatato na produção *in vitro* de embriões bovinos
Enalaprilat in in vitro production of bovine embryos

(De acordo com as instruções da revista *Reproduction in Domestic Animals*)

Enalaprilato na produção *in vitro* de embriões bovinos

Enalaprilat in in vitro production of bovine embryos

D. Kunkel¹

¹ Doutoranda em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.
danikunkel@hotmail.com

Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar se a inibição da ECA com o enalaprilato tem influência direta nas taxas de clivagem, blastocisto e eclosão quando adicionado ao meio de maturação, fertilização e cultura *in vitro*. Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas, abatidas em abatedouro de inspeção municipal com inspeção municipal em Teresina-PI e transportados para o laboratório em um recipiente térmico com solução DMPBS (Nutricell[®]), a 37°C. Foram utilizados 20 a 25 oócitos por tratamento e com 6 repetições. Os tratamentos foram divididos em: controle (ausência de enalaprilato), Enalaprilato 1 µM, Enalaprilato 2 µM e Enalaprilato 4 µM. Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram recuperados por aspiração de folículos antrais, utilizando seringa de 3mL e agulha 21G, ambas descartáveis. O líquido folicular obtido foi colocado em tubo de sedimentação de 15mL e armazenado em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Os CCOs selecionados foram lavados em meio de maturação (Gene Up Biotecnologia[®]) e maturados, de acordo com tratamentos, em microplacas contendo 100 µL de meio de maturação (Gene Up Biotecnologia[®]), mais soro fetal bovino (SFB) a 10%, sob óleo mineral em incubadora com uma atmosfera de 5% de CO₂ a 38,5° C por um período de 22 horas. Após esse período, os oócitos maturados foram submetidos ao processo de fertilização, onde foram lavados três vezes em meio de fertilização (Gene Up Biotecnologia[®]). Em seguida sêmen foi descongelado em água a 37 °C por 30 segundos e depois depositado em um microtubo de 2 mL, sobre um gradiente de Percoll de 90 e 45% (Gene Up Biotecnologia[®]). CCOs e os espermatozóides foram co-incubados a uma temperatura de 38,5°C por 20 horas, com 5% de CO₂ em ar. Após a fertilização, os prováveis zigotos foram lavados 3 vezes em SOF (Gene Up Biotecnologia[®]) e cultivados em estufa a 38,5°C, em CO₂ a 5%, por 7 dias. O enalaprilato nas concentrações de 1 µM, 2 µM e 4 µM em todas as etapas da produção *in vitro* de embriões não produziu alteração significativa nos resultados ($p > 0,05$), na comparação entre os tratamentos e o grupo controle, em relação a taxa de clivagem e a taxa de blastocistos. Conclui-se que o enalaprilato não influenciou a produção de embriões bovinos *in vitro* e, portanto, os efeitos da inibição da ECA em experimentos *in vivo* não são explicados pela ação direta sobre o complexo cumulus-oócito.

Palavras chave: clivagem, blastocisto, embrião, inibidor da ECA

Abstract

Previous research shows the favorable effect of inhibiting the angiotensin-converting enzyme (ACE) on the efficiency of fixed-time artificial insemination (TAI). The aim of this study was to verify whether ACE inhibition with enalaprilat has a direct influence on cleavage, blastocyst and hatching rates when added to the maturation, fertilization and *in vitro* culture medium. The ovaries were obtained from bovine females, slaughtered in an

establishment with municipal inspection in Teresina-PI and transported to the laboratory in a thermal container with DMPBS solution (Nutricell[®]), at 37°C. 20 to 25 oocytes were used per treatment and with 6 repetitions. The treatments were divided into: control (absence of enalaprilat), Enalaprilat 1 µM, Enalaprilat 2 µM and Enalaprilat 4 µM. Cumulus-oocyte complexes (CCOs) were recovered by aspiration of antral follicles, using a 3mL syringe and 21G needle, both disposable. The follicular liquid obtained was placed in a 15mL sedimentation tube and stored in a water bath at 37°C for 10 minutes. The selected CCOs were washed in maturation medium (Gene Up Biotecnologia[®]) and matured, according to treatments, in microplates containing 100 µL of maturation medium (Gene Up Biotecnologia[®]), plus 10% fetal bovine serum (SFB), under mineral oil in an incubator with an atmosphere of 5% CO₂ at 38.5° C for a period of 22 hours. After this period, the matured oocytes were subjected to the fertilization process, where they were washed three times in a fertilization medium (Gene Up Biotecnologia[®]). Then the semen was thawed in water at 37 °C for 30 seconds and then deposited in a 2 mL microtube, over a Percoll gradient of 90 and 45% (Gene Up Biotecnologia[®]). CCOs and spermatozoa were co-incubated at a temperature of 38.5°C for 20 hours, with 5% CO₂ in air. After fertilization, the probable zygotes were washed 3 times in SOF (Gene Up Biotecnologia[®]) and kept in an incubator at 38.5°C, in 5% CO₂, for 7 days. Enalaprilat at concentrations of 1 µM, 2 µM and 4 µM in all stages of in vitro embryo production did not produce significant changes in the results ($p > 0.05$), when comparing treatments and the control group, in relation to cleavage rate and blastocyst rate. It is concluded that enalaprilat did not influence the production of bovine embryos in vitro and, therefore, the effects of ACE inhibition in in vivo experiments are not explained by the direct action on the cumulus-oocyte complex.

Keywords: cleavage, blastocyst, embryo, ACE inhibitor

Introdução

A produtividade dos rebanhos bovinos tem aumentado significativamente, devido à intensa seleção, características produtivas e o aperfeiçoamento das biotécnicas de reprodução assistida promovendo significantes contribuições para intensificar essa seleção. A inseminação artificial em tempo fixo, transferência de embriões e a produção de embriões in vitro (PIV) vêm sendo desenvolvidas a fim de maximizar o potencial reprodutivo de fêmeas bovinas melhorando os indicadores de produtividade (Buratini Jr., 2006). Dentre as biotécnicas da reprodução assistida a PIV é a mais recente e uma das mais importantes, já sendo utilizada em escala comercial no Brasil e no mundo.

As etapas que compõe a PIV são maturação, fertilização e cultivo (Gonçalves et al., 2008), sendo a maturação a etapa mais crítica, pois envolve uma série de mudanças no citoplasma e no núcleo do oócito, para que possa ser fecundado e cultivado até o estágio de blastocisto (Mello et al., 2016). O oócito durante seu desenvolvimento se encontra no estágio de vesícula germinativa, in vivo a maturação nuclear ocorre após o pico pré-ovulatório de LH durante o estro, levando naturalmente a ovulação, já na produção *in vitro* compreende-se que a retirada do oócito do contato com as células

foliculares é o fator primordial para dar início ao processo de maturação nuclear (Gonçalves et al., 2007; Varago et al., 2008).

A fim de compreender os fatores que compõem e afetam a maturação nuclear, e conseqüentemente a fertilização e o cultivo de embriões, vários estudos vem sendo realizados ao longo dos anos, os quais identificaram a presença do sistema renina angiotensina no sistema reprodutor dos machos (célula de Leydig e células espermáticas) e fêmeas (oócitos e células da granulosa) (Gonçalves et al., 2012).

Existem evidências que reforçam a presença do SRA ovariano como: a concentração de angiotensina-II (Ang-II) no fluido folicular de ratas após o tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG), e a presença de elevados níveis de Ang-II no fluido folicular após a nefrectomia bilateral (Husain et al., 1987), além da produção de Ang-II nos ovários de coelha expostos *in vitro* ao hCG, apresentando uma grande importância nos processos de maturação do oócito e na ovulação (Yoshimura et al., 1994; Yoshimura et al., 1996). Em relação a maturação nuclear a Ang-II seria capaz de reverter o efeito inibitório das células da teca na maturação nuclear de oócitos bovinos (Giometti et al., 2005), já que a Ang-II faz parte do mecanismo de controle parácrino e autócrino presente no ovário durante a ovulação em bovinos (Ferreira et al., 2011).

A enzima conversora da angiotensina (ECA) também foi identificada como um dos componentes reguladores durante o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária, já que está distribuída na superfície folicular dos oócitos e na zona pelúcida (Brentjens et al., 1986), como em ratas estando presente ao redor do corpo lúteo e em alguns folículos (Raposo-Costa; Reis, 2000). A inibição da ECA pode ser realizada através da utilização de inibidores como enalapril, causando um bloqueio reversível na conversão de angiotensina I em Ang-II (Tavares et al., 2015). A inibição da ECA leva a diminuição da disponibilidade de Ang-II e aumento da disponibilidade de Ang-(1-7) (Brosnihn et al., 1999).

Além disso, em pesquisas realizadas em nosso laboratório, utilizando o enalapril, inibidor da ECA, foram observados resultados promissores para pequenos ruminantes, como o aumento no número de embriões caprinos transferíveis e a melhora de sua qualidade, além do aumento no número de gestações e produtos nascidos por transferência de embriões (Oliveira, 2003; Feitosa, 2010). No entanto, não se tem conhecimento se tal efeito se deve a efeito direto sobre o complexo cúmulo-oócito (CCO) sobre outros elementos ou mensageiros presentes no líquido folicular ou no meio circulante.

O enalaprilato foi utilizado na presente pesquisa por ser a forma ativa do enalapril e, neste experimento *in vitro*, não haveria possibilidade da hidrólise hepática necessária para converter o pró-fármaco enalapril na forma ativa enalaprilato (Thongnopnua; Poeaknapo, 2005). Portanto, o objetivo do estudo foi verificar a influência do enalaprilato na produção de embriões bovinos e na qualidade desses embriões quando acrescentado em meio de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*, sem a possibilidade de influenciar sobre outros elementos ou mensageiros que não estão presentes no protocolo de cultivo *in vitro*.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no laboratório de Ciências Fisiológicas e laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina – PI, Brasil. Os protocolos experimentais estão de acordo com as resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI sob o número 574/19.

Para avaliar o efeito do enalaprilato na produção *in vitro* de embriões, foram utilizados 480 oócitos, cultivados na ausência ou presença de enalaprilato, nas etapas de maturação, fertilização e cultivo. Os CCOs foram divididos em quatro grupos ou tratamentos com 6 repetições, onde cada repetição possuía de 20 a 25 CCOs.

Os grupos foram divididos de acordo com as concentrações utilizadas onde: grupo controle (C) ausência de enalaprilato em todas as fases da PIV; grupo enalaprilato 1 μM (E1); grupo enalaprilato 2 μM (E2) e grupo enalaprilato 4 μM (E4) com a adição de enalaprilato em todas as fases da PIV.

Obtenção do ovário e aspiração dos folículos antrais

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA), da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campos Socopo, Teresina-PI. Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas abatidas em matadouro sob inspeção municipal, localizado no Município de Teresina-PI, transportados até o laboratório em um recipiente térmico com solução DMPBS - FLUSH (Nutricell[®]) a uma temperatura de 37°C. O tempo entre a obtenção e o transporte do frigorífico ao laboratório não foi superior a 2 horas. No laboratório, os ovários foram lavados com solução DMPBS - FLUSH (Nutricell[®]) a 37°C e os complexos cumulus-oócitos (CCOs) recuperados por aspiração dos folículos antrais, utilizando agulhas descartáveis 25 x 8 mm (21G),

acopladas a uma seringa de 3mL. O líquido folicular obtido foi colocado em um tubo do tipo Falcon de 15mL e armazenado em banho-maria a 37°C, durante 10 minutos para sedimentação.

O conteúdo do aspirado folicular foi depositado em uma placa de Petri de 100 x 20 mm para rastreamento dos CCOs sob uma lupa estereomicroscópica. Os CCOs selecionados foram transferidos para uma placa de Petri 30 x 10 mm contendo meio de manutenção TQC Holding Plus (Biodux[®]), e classificados de acordo com a qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV (Leidfried; First, 1979). Somente os CCOs viáveis (Grau I e II) foram selecionados para maturação de acordo com os tratamentos.

Maturação in vitro (MIV)

Os CCOs selecionados, foram lavados em meio de maturação (Gene Up Biotecnologia[®]), em placas de petri 100 x 20mm e maturados de acordo com o tratamento 0; 1; 2 e 4 µM de enalaprilato, em microgotas contendo 100 µL de meio de maturação (Gene Up Biotecnologia[®]), composto por TCM 199 e 10% de soro fetal bovino (SFB), sob óleo mineral em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar atmosférico, a 38,5°C por um período de 22 horas.

Fertilização in vitro (FIV)

Os CCOs maturados foram lavados três vezes em meio de fertilização (Gene Up Biotecnologia[®]), constituído por heparina, PHE (penicilina, hipotaurina e epinefrina) e albumina sérica bovina (BSA) (Gene Up Biotecnologia[®]). O sêmen foi descongelado em água a 37°C por 30 segundos, sendo em seguida depositado em um microtubo de 2mL, sobre um gradiente de Percoll de 90 e 45% (Gene Up Biotecnologia[®]), e submetido a centrifugação em 8000rpm durante 7 minutos. Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante, os espermatozoides ressuspensos em 1mL de meio de fertilização (Gene Up Biotecnologia[®]), e submetidos a nova centrifugação durante 5 minutos a 3200rpm. Após a segunda centrifugação, o excesso de meio de capacitação foi retirado, sendo adicionada do mesmo volume de meio de fecundação (Gene Up Biotecnologia[®]) suplementado com 20 µL de heparina e 40 µL de PHE (Gene Up Biotecnologia[®]). Em seguida foram retirados 5 µL de sêmen, colocando em um microtubo contendo 250 µL de água destilada, para determinação da concentração espermática, pela contagem de células espermáticas em câmara de Neubauer. A concentração espermática foi ajustada para 1×10^6 espermatozoides vivos/mL. Posteriormente, os CCOs e os espermatozoides foram co-incubados em temperatura de 38,5°C por 20 horas, em 5% de CO₂.

Cultivo in vitro (CIV)

Após a FIV, os presumíveis zigotos foram isolados das células do cumulus mediante sucessivas aspirações. Os prováveis zigotos foram lavados três vezes em meio SOF (Gene Up Biotecnologia[®]), suplementado com 5% de SFB. Posteriormente os mesmos foram transferidos para uma placa de Petri 60 x 15 mm, contendo microgotas de 100 µL de meio SOF (Gene Up Biotecnologia[®]) suplementado com 5% de SFB e mantidos em estufa à temperatura de 38,5°C, em 5% de CO₂, durante 7 dias. No quinto dia de cultivo foi realizado o “*feeding*”, que é a troca de 50% do meio SOF por um novo meio previamente estabilizado. A avaliação da taxa de clivagem foi realizada após 48 horas (D3) do início do cultivo e a formação de blastocisto após 168 horas (D7). A qualidade das estruturas encontradas no D7 foi avaliada através dos parâmetros estabelecidos pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS), de acordo com Bó e Mapletoft, (2013).

Análise Estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado e os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis ao nível de 5% de probabilidade, já para os dados paramétricos foi realizado ANOVA e para a comparação de médias o teste de Holm-Sidak. Os resultados foram expressos como média para dados paramétricos e porcentagem para os não paramétricos. Os dados foram avaliados pelo programa SigmaStat versão 3.5 (Systat Software, Inc).

Resultados

Neste experimento avaliou-se a influência do enalaprilato nas concentrações de 1, 2 e 4 µM adicionados aos meios de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* de oócitos bovinos sob a taxa de clivagem, a qual não apresentou diferença significativa entre os tratamentos em relação ao controle (77%), (Tabela 1).

Tabela 1: Taxa de clivagem de oócitos bovinos cultivados em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de enalaprilato.

Grupos	Controle	Enalap. a 1 µM	Enalap. a 2 µM	Enalap. 4 µM
Taxa de clivagem	77% (103/133)	81% (103/128)	78% (106/132)	66% (80/116)

Variável avaliada pelo teste de Kruskal Wallis, não houve diferença significativa a 5% de probabilidade, $p>0,05$.

Quanto à taxa de blastocisto, avaliada no sétimo dia de cultivo (D7), os resultados demonstraram que não houve efeito significativo ($p>0,05$) da adição do enalaprilato aos meios de produção in vitro de embriões.

Tabela 2: Taxa de blastocisto e estruturas encontradas no D7 de oócitos bovinos, cultivados em meio acrescidos de enalaprilato.

Estruturas	Controle	Enalap. a 1 µM	Enalap. a 2 µM	Enalap. 4 µM
Mórula C.	9	5	2	2
Blastocisto inicial	33	46	48	35
Blastocisto	67	40	35	23
Blastocisto expandido	3	2	4	4
Infertilizados	8	5	5	2
Taxa de blastocisto (%)	76,66% (103/133)	68,83% (88/ 128)	65,9% (87/ 132)	53,5% (62/116)

Variável avaliada pelo teste de Kruskal Wallis, não houve diferença significativa a 5% de probabilidade, $p>0,05$.

A tabela 3 apresenta os resultados referentes a classificação da qualidade dos embriões, os quais não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos. Entretanto, quando avaliado individualmente cada tratamento observou-se diferença significativa ($p<0,05$) na qualidade das estruturas encontradas no sétimo dia do cultivo, verificando-se que em todos os tratamentos, a maior parte dos blastocistos encontrados se classificam com qualidade excelente e bom, mostrando qualidade do protocolo e dos procedimentos experimentais utilizados.

Tabela 3: Classificação da qualidade dos blastocistos bovinos no D7 submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de enalaprilato.

Qualidade	Controle	Enalap. a 1 μ M	Enalap. a 2 μ M	Enalap. 4 μ M
Excelente	10,00 \pm 1,25 ^a	11,33 \pm 1,25 ^a	10,83 \pm 1,25 ^a	8,66 \pm 1,25 ^a
Bom	7,33 \pm 1,25 ^a	5,83 \pm 1,25 ^b	3,33 \pm 1,25 ^b	2,83 \pm 1,25 ^b
Pobre	1,50 \pm 1,25 ^b	1,00 \pm 1,25 ^c	1,33 \pm 1,25 ^b	1,16 \pm 1,25 ^b
Infertilizados /degenerados	1,50 \pm 1,25 ^b	0,83 \pm 1,25 ^c	0,83 \pm 1,25 ^b	0,66 \pm 1,25 ^b

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a 5% de probabilidade, $p < 0,05$. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos, representados pelas colunas. Classificação dos embriões de acordo com Bó; Mapletotf, (2013).

Discussão

Os resultados obtidos para a taxa de clivagem demonstraram que a adição de diferentes concentrações de enalaprilato aos meios de maturação, fertilização e cultivo in vitro de embriões bovinos não influenciou os índices observados para esta variável. Entretanto, analisando-se apenas os números, observa-se que houve uma queda gradual do percentual de blastocistos à medida que foi aumentada a concentração de enalaprilato, partindo da maior taxa no controle, ao menor percentual na concentração de 4 μ M. Por outro lado, quando analisada a quantidade de estruturas que chegaram ao estágio de blastocisto expandido no D7, os grupos com 2 e 4 μ M apresentaram um número maior de estruturas quando comparados aos demais tratamentos. Embora não seja possível tirar conclusões a respeito de dados numéricos sem diferença estatística, isso pode ser um indicativo para aprofundamento do estudo em experimentos posteriores.

O enalaprilato é um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) e esta foi encontrada difundida pela superfície folicular e na zona pelúcida, demonstrando a possibilidade de atuação do enalaprilato durante o desenvolvimento folicular e a maturação dos oócitos (Brentjens et al., 1986), podendo também ser encontrada no corpo lúteo de vacas (Shauser et al., 2001). A ECA é responsável pela conversão da angiotensina I (Ang-I) em Angiotensina II (Ang-II), esta por sua vez encontra-se presente nas células da granulosa. Está também associada ao processo de angiogênese durante a ovulação, à formação do corpo lúteo e luteólise. Além da função de regular o crescimento folicular, a Ang-II também possui função no mecanismo de controle autócrino e parácrino durante a ovulação em suínos, coelhos e vacas (Ferreira et al., 2011; Stefanello et al., 2006, Li et

al., 2004; Acosta et al., 2000; Féral et al., 1995). Os dados da literatura demonstram que a ECA está presente nos mesmos locais de ação da Ang-II, podendo com isso, alterar a disponibilidade de Ang-II e influenciar o desenvolvimento dos folículos bem como a ovulação (Pan et al., 2013). No entanto, os resultados do presente trabalho, com a adição do enalaprilato aos meios de maturação, fertilização e cultivo de embriões *in vitro* demonstram que a inibição da ECA não influenciou na taxa de blastocisto, mesmo com a provável diminuição da disponibilidade de Ang-II, a qual poderia agir na formação de blastocistos, mas isso não foi observado, provavelmente porque sua ação na maturação dos oócitos se dá através das células da teca (Stefanello et al., 2006), ausentes no modelo de cultivo adotado no experimento.

Outro mecanismo que poderia influenciar os resultados seria a presença de espécies reativas de oxigênio, porque a ECA pode aumentar o estresse oxidativo e as espécies reativas de oxigênio (EROs), por meio do aumento da produção de Ang-II e as EROs são prejudiciais para a reprodução (Agarwal et al., 2005; Ruder et al., 2008). Portanto, a ECA induz a produção excessiva de Ang-II que poderia prejudicar a habilidade reprodutiva através do aumento do estresse oxidativo (Yoshimura et al., 1994). Com a inibição da ECA pelo enalapril, foi observado bloqueio da produção de Ang-II e um aumento da ação antioxidante em cérebro de ratos com neurodegeneração (Kmet et al., 2019) e o enalaprilato inibiu a produção de peróxido de hidrogênio pelas células mesangiais *in vitro* (Muñoz et al., 1997).

Em pesquisas realizadas em nosso laboratório, utilizando o enalapril, inibidor da ECA, foi observado o aumento no número de embriões caprinos transferíveis e a melhora de sua qualidade, além do aumento no número de gestações e produtos nascidos por transferência de embriões (Oliveira, 2003; Feitosa, 2010). No entanto, não se tem conhecimento se tal efeito se deve a efeito direto sobre o complexo cúmulo-oócito (CCO) sobre outros elementos ou mensageiros presentes no líquido folicular ou no meio circulante. Neste experimento objetivou-se verificar a influência do enalaprilato na produção de embriões bovinos e na qualidade desses embriões quando acrescentado em meio de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*, sem a possibilidade de influência sobre outros elementos ou mensageiros que não estão presentes no modelo de cultivo *in vitro*. Observou-se então que o enalaprilato não influenciou nos parâmetros observados referentes à produção de embriões bovinos *in vitro*, portanto, os efeitos da inibição da ECA nos experimentos anteriores, *in vivo*, parecem não ser resultado de ação direta do

enalaprilato ou dos peptídeos cuja produção é aumentada com a inibição da ECA, sobre o complexo cumulus-oócito.

Conclui-se que o enalaprilato não influenciou na produção *in vitro* de embriões bovinos, e que os efeitos favoráveis obtidos em modelos de reprodução *in vivo* não se reproduziram neste experimento.

Referências

Acosta, T. J., Ozawa, T., Kobayashi, S., Hayashi, K., Ohtani, M., Kraetzel, W. D., Sato, K., Schams, D., Miyamoto, A. (2000). Periovarian changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin F_{2α}, and steroid hormones from bovine mature follicles *in vivo*. **Biology of Reproduction**, 63, 1253–1261.

Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproduction Biology and Endocrinology**, 3, 1–21.

Bó, G. A., Mapletoft, R. J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. **Animal Reproduction**, 10, 344-348.

Brentjens, J. R., Matsuo, S., Andres, G. A., Caldwell, P. R., & Zamboni, L. (1986). Gametes contain angiotensin converting enzyme (kininase II). **Experimentia**, 42, 399–402.

Brosnihan, K. B., Senanayake, P. S., Li, P., Ferrario, C. M. (1999). Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 32, 373-381.

Buratini Jr., J. (2006). Foliculogênese em bovinos. In: II Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina, PR. **Anais...** Londrina: UEL, 55-62.

Feitosa, L. C. S. (2010). **Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) na produção de embriões por superovulação em cabras Boer**. 2010. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Teresina, PI: Universidade Federal do Piauí.

Féral, C., le Gall, S., Leymarie, P. (1995). Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: Its possible involvement in atresia. **European Journal of Endocrinology**, 133, 747–753.

Ferreira, R., Gasperin, B., Rovani, M., Santos, J., Barreta, M., Bohrer, R., Price, C., Gonçalves, P. B. D. (2011). Angiotensin II signaling promotes follicle growth and dominance in cattle. **Endocrinology**, 152, 4957–4965.

Giometti, I. C., Bertagnolli, A. C., Ornes, R. C., Da Costa, L. F. S., Carambula, S. F., Reis, A. M., De Oliveira, J. F. C., Emanuelli, I. P., Gonçalves, P. B. D. (2005). Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, 63, 1014-1025.

Gonçalves, P. B. D., Barreta, M. B., Sandri, L. Ferreira, R., Antoniazzi, A. Q. (2007). Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, 31, 212-217.

Gonçalves, P. B. D., Figueiredo, J. R., Freitas, V. J. F. (2008). **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. 2 ed., São Paulo: Roca.

Gonçalves, P. B. D., Ferreira, R., Gasperin, B., Oliveira, J. F. (2012). Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: A review of recent advances. **Reproduction**, 143, 11-20.

Husain, A., Bumpus, F. M., Silva, P. D., Speth, R. C. (1987). Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovaries. **Proceedings of the National Academy Science**, 84, 2489-2493.

Kmet O., Filipets N., Kmet T., Hrachova T., Vepruk Y. (2019). Enalapril effect on glutathione chan of e antioxidant system of the brain in rats with scopolamine-induced neurodegeneration. **Georgian Medical News**, 291, 98-100.

Leibfried-Rutledge, M. L., First, N. L. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal of Animal Science**, 83, 76-86.

Li, Y., Jiao, L., Liu, R., Chen, X., Wang, H., Wang, W. (2004). Localization of angiotensin II in pig ovary and its effects on oocyte maturation in vitro. **Theriogenology**, 61, 447–459.

- Mello, R. R. C., Ferreira, J. E., Sousa, S. L. G., Mello, R. B., Palhano, H. B. (2016). Produção in vitro (PIV) de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 40, 58-64.
- Muñoz, L. M. R., F. V. Vanaclocha, Lampreabe, I. (1997). Enalaprilat inhibits hydrogen peroxide production by murine mesangial cells exposed to high glucose concentrations. **Nefrology Dialysis Transplantation**, 12, 456-464.
- Oliveira, P. F. N. M. (2003). **Efeito do enalapril e da somatotropina recombinante bovina na superovulação em caprinos**. 2003. 65p. Dissertação (mestrado em Ciência Animal). Teresina, PI: Universidade Federal do Piauí.
- Pan, P. P., Qi-Tao, Z., Fang, L., Ying-Ming, Z., Fan J. (2013). Angiotensin-converting enzyme play dominant rule in fertility. **International Journal of Molecular Sciences**, 14, 21071-21086.
- Raposo-Costa, A. P., Reis, A. M. (2000). O sistema Renina-Angiotensina em ovário. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, 44, 306-313.
- Ruder, E. H., Hartman, T. J., Blumberg, J., Goldman, M. B. (2008). Oxidative stress and antioxidants: Exposure and impact on female fertility. **Human Reproductive Update**, 14, 345–357.
- Schauser, K. H., Nielsen, A. H., Winther, H., Dantzer, V., Pousen, K. (2001). Localization of the renin-angiotensin system in the bovine ovary: cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. **Biology of Reproduction**, 65, 1672-1680.
- Stefanello, J. R., Barreta, M. H., Porciuncula, P. M., Arruda, J. N., Oliveira, J. F., Oliveira, M. A., Gonçalves, P. B. (2006). Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. **Theriogenology**, 66, 2068–2076.
- Tavares, M. T., Primia, M. C., Pollib, M. C., Ferreira, E. I., Parise-Filho, R. (2015). Interações fármaco-receptor: aplicações de técnicas computacionais em aula prática sobre a evolução dos inibidores da enzima conversora de angiotensina. **Química Nova**, 38, 1117-1124.

Thongnopnua, P., Poeaknapo, C. (2005). High-performance liquid chromatographic determination of enalapril in human plasma by enzyme kinetic analytical method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 37, 763-769.

Varago, F. C., Mendonça, L. F., Lagares, M. A. (2008). Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 32, 100-109.

Yoshimura, Y., Karube, M., Aoki, H., Oda, T., Koyama, N., Nagai, A., Akimoto, Y., Hirano, H., Nakamura, Y. (1996). Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT₂ receptor subtype. **Endocrinology**, 137, 1204-11.

Yoshimura, Y., Koyama, N., Karube, M., Oda, T., Akiba, M., Yoshinaga, A., Shiokawa, S., Jinno, M., Nakamura, Y. (1994). Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. **Journal of Clinical Investigation**, 93, 180-187.

7 CAPÍTULO 3

Influência do enalaprilato e do inibidor da angiotensina (1-7) na produção *in vitro* de embriões bovinos

Influence of enalaprilat and angiotensin inhibitor (1-7) on the in vitro production of bovine embryos

(De acordo com as instruções da revista *Reproduction in Domestic Animals*)

Influência do enalaprilato e do inibidor da angiotensina (1-7) na produção *in vitro* de embriões bovinos

Influence of enalaprilat and angiotensin inhibitor (1-7) on the in vitro production of bovine embryos

D. Kunkel¹

¹ Doutoranda em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.
danikunkel@hotmail.com

Resumo

O objetivo do estudo foi verificar a influência do enalaprilato e A-779 na produção de embriões bovinos e na qualidade desses embriões quando acrescentado em meio de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*. Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas, abatidas em estabelecimento com inspeção municipal em Teresina-PI e transportados até o laboratório em um recipiente térmico com solução de DMPBS (Nutricell[®]) a uma temperatura de 37°C. No experimento foram utilizados de 20 a 25 oócitos por tratamento, com 6 repetições, os tratamentos foram divididos em: controle (ausência de enalaprilato), A-779 2 µM, Enalaprilato 2 µM e Enalaprilato 2 µM + A-779 2 µM. Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram recuperados por aspiração dos folículos antrais, utilizando agulhas (21G) acopladas a seringas descartáveis de 3mL. O líquido folicular obtido foi colocado em tubo do tipo Falcon de 15mL e armazenado em banho-maria a 37°C, durante 10 minutos para sedimentação. Os CCOs selecionados foram lavados em meio de maturação (Gene Up Biotecnologia[®]) e maturados, de acordo com os tratamentos, em microgotas contendo 100 µL de meio de maturação (Gene Up Biotecnologia[®]), acrescido de 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), sob óleo mineral em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂, a 38,5°C, por um período de 22 horas. Após este período, os oócitos maturados seguiram para a fertilização, onde foram lavados 3 vezes em meio de fertilização (Gene Up Biotecnologia[®]). O sêmen foi descongelado em água a 37 °C por 30 segundos, sendo em seguida depositado em um microtubo de 2mL, sobre um gradiente de Percoll de 90 e 45% (Gene Up Biotecnologia[®]). Os CCOs e os espermatozoides foram co-incubados em temperatura de 38,5°C por 20 horas, em 5% de CO₂ em ar. Após a FIV os prováveis zigotos foram lavados 3 vezes em meio SOF (Gene Up Biotecnologia[®]) e colocados para cultivo em estufa à temperatura de 38,5°C, em 5% de CO₂, durante 7 dias. Os resultados para os tratamentos A-779 2 µM, Enalaprilato 2 µM e Enalaprilato 2 µM + A-779 2 µM em todas as fases da produção *in vitro* de embriões não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) para a taxa de clivagem e para a taxa de blastocisto. Na avaliação da qualidade dos embriões quanto à quantidade e proporção de células presentes no D7 foi observado aumento do número de células do trofoblasto (TE) e total de células (TC) nos tratamentos com A-779, enalaprilato e associação entre eles, em relação ao controle. Isso parece evidenciar que tanto o A-779, quanto o enalaprilato, isolados ou em associação, favoreceram o aumento do número de células presentes nos embriões. Conclui-se que os tratamentos com o enalaprilato, A-779 e enalaprilato associado com A-779 apresentaram efeito proliferativo para as células embrionárias e efeito positivo para a qualidade embrionária avaliada pela proporção de células.

Palavras chave: clivagem, blastocisto, embrião, inibidor da ECA, inibidor da Ang-(1-7)

Abstract

The aim of the study was to investigate the influence of A-779 and enalaprilat in the production of bovine embryos and quality of these embryos when added in maturation medium, fertilization and in vitro culture. The ovaries were obtained from bovine females, slaughtered in a slaughterhouse with municipal inspection in Teresina-PI and transported to the laboratory in a thermal container with DMPBS solution (Nutricell®) at a temperature of 37°C. The experiment used an average of 20 to 25 oocytes per repetition, 6 repetitions were performed in this experiment, the treatments were divided into: control (absence of enalaprilat), Enalaprilat 1 µM, Enalaprilat 2 µM and Enalaprilat 4 µM. Cumulus-oocyte complexes (OCCs) recovered by aspiration of the antral follicles using a 25 x 8 mm (21G) disposable needle coupled to a 3mL syringe. The follicular fluid obtained was placed in a 15mL Falcon tube and stored in a water bath at 37°C for 10 minutes for sedimentation. The selected OCCs were washed in maturation medium (Gene Up Biotechnology®) and matured according to the treatments in micro droplets containing 100 µL of maturation medium (Gene Up Biotechnology®), plus 10% SFB (Fetal Beef Serum), under mineral oil in a 5% CO₂ atmosphere incubator in air at 38.5 °C for a period of 22 hours. After this period, the mature oocytes went to the fertilization stage, where they were washed 3 times in fertilization medium (Gene Up Biotechnology®). Semen was thawed in water at 37 °C for 30 seconds and then deposited in a 2mL microtube over a 90 and 45% Percoll gradient (Gene Up Biotechnology®). The COCs and sperm were co-incubated at 38.5°C for 20 hours in 5% CO₂ in air. After IVF the probable zygotes were washed 3 times in SOF (Gene Up Biotechnology®) medium and placed in a greenhouse at 38.5°C in 5% CO₂ for 9 days. The results for treatments A-779 2 µM, Enalaprilat 2 µM and Enalaprilat 2 µM + A-779 2 µM in all stages of in vitro embryo production showed no significant difference ($p > 0.05$) for the cleavage rate and for the blastocyst rate. In evaluating the quality of embryos regarding the quantity and proportion of cells present in D7, an increase in the number of trophoblast cells (TE) and total cells (TC) was observed in treatments with A-779, enalaprilat and the association between them, in relation to control group. This seems to show that both A-779 and enalaprilat, alone or in combination, favored an increase in the number of cells present in the embryos. It was concluded that the treatments with enalaprilat, A-779 and enalaprilat associated with A-779 showed a proliferative effect for embryonic cells and a positive effect for embryonic quality evaluated by the proportion of cells.

Keywords: cleavage, blastocyst, embryo, ACE inhibitor, Ang-(1-7) inhibitor.

Introdução

A produção in vitro (PIV) de embriões se estabeleceu como um importante biotécnica de reprodução assistida empregada no melhoramento genético de rebanhos de interesse econômico. Além disso, a PIV também é considerada uma excelente ferramenta para pesquisa de fenômenos biológicos que ocorrem durante a maturação, fecundação e cultivo in vitro de oócitos, capacitação espermática, eventos relacionados ao início do desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação e estudo e desenvolvimento de

outras biotécnicas reprodutivas a partir da micromanipulação de gametas e embriões (Gonçalves et al., 2007).

A fim de obter maior conhecimento sobre os fenômenos biológicos que ocorrem durante a maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de oócitos, várias pesquisas realizadas identificaram a ação do sistema renina angiotensina no ovário (Yoshimura et al., 1996; Costa et al., 2003; Li et al., 2004; Obermüller et al., 2004), bem como os seus principais componentes: renina, enzima conversora da angiotensina (ECA), angiotensina II (Ang-II) e seus receptores (AT1 e AT2) e a angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) e seu receptor MAS podem ser encontrado nos ovários de diferentes espécies (Costa et al., 2003; Reis et al., 2011; Viana et al., 2011; Yoshimura, 1997), os quais atuam estimulando a esteroidogênese, foliculogênese, maturação oocitária, ovulação e atresia (Costa et al., 2003; Peña et al., 2010; Tonello dos Santos et al., 2012). A Ang-(1-7)/ MAS pode ser regulada positivamente pela ação das gonadotrofinas (Honorato-Sampaio et al., 2012; Pereira et al., 2009), porém, quando o A-779, antagonista específico do receptor MAS, foi utilizado, ocorreu o bloqueio do efeito de Ang-(1-7) na retomada meiótica e ovulação, o A-779 também diminuiu o efeito estimulador da gonadotrofina, apontando para um possível papel de Ang-(1-7) como um intermediário da gonadotrofina durante o processo ovulatório (Viana et al., 2011; Honorato-Sampaio et al., 2012).

A distribuição da ECA na superfície folicular dos oócitos e na zona pelúcida, faz com que ela seja suspeita de ser um dos componentes reguladores durante o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária (Brentjens et al., 1986). Em ratas está presente ao redor do corpo lúteo e em alguns folículos (Raposo-Costa; Reis, 2000). Nos estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa o enalapril, inibidor da ECA, foi utilizado com a finalidade de verificar sua ação no ovário de diferentes espécies como ratos, coelhos, ovelhas, cabras (Costa et al., 2003; Viana et al., 2011; Pereira et al., 2015; Costa et al., 2014; Fernandes Neto, et al., 2018), também foi observado aumento no número de embriões caprinos transferíveis e melhora de sua qualidade, além do aumento no número de gestações e produtos nascidos por transferência de embriões (Oliveira, 2003; Feitosa, 2010).

A aplicação do enalapril causa bloqueio conversão de angiotensina I em Ang-II (Tavares et al., 2015), levando a diminuição da disponibilidade de Ang-II e aumento da disponibilidade de Ang-(1-7) (Brosnihn et al., 1999). Entretanto, no presente estudo, com cultivo de oócitos *in vitro*, em vez de enalapril, foi utilizado o enalaprilato, que é a forma

ativa do enalapril. O enalapril é um pró-fármaco que precisa ser hidrolisado no fígado a enalaprilato para ter o efeito de inibidor da ECA (Thongnopnua; Poeaknapo, 2005).

Em razão dos resultados obtidos na produção de embriões caprinos *in vivo* e na inseminação artificial em tempo fixo, faz-se necessário investigarmos os possíveis mecanismos envolvidos. Neste estudo, foi avaliado se a utilização do inibidor da ECA teria efeito em cultivo *in vitro*, onde só estão presentes o oócito e o *cumulus oophorus* e se esse efeito é devido à formação de angiotensina-(1-7).

Utilizou-se então o enalaprilato e o A-779, acrescentados aos meios de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*, com o objetivo de verificar a influência da angiotensina II e angiotensina-(1-7) na produção de embriões bovinos *in vitro* e na qualidade desses embriões.

Materiais e Métodos

O experimento realizado nos laboratórios de Ciências Fisiológicas e Biotecnologia da Reprodução Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina – PI, Brasil. Os protocolos experimentais estão de acordo com as resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI sob o número 574/19.

Para avaliar o efeito do Enalaprilato na produção *in vitro* de embriões, foram utilizados 480 oócitos, cultivados na ausência ou presença de Enalaprilato e A-779, nas etapas de maturação, fertilização e cultivo. Os CCOs foram divididos em quatro tratamentos em 6 repetições onde cada um possuía de 20 a 25 CCOs por repetição. Os tratamentos foram: grupo controle – sem a presença de enalaprilato e A-779; grupo enalaprilato a 2 μ M; grupo A-779 a 2 μ M, grupo enalaprilato a 2 μ M + A-779 a 2 μ M, sendo que todas as substâncias dos tratamentos foram adicionadas em todas as fases da PIV.

Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas abatidas em estabelecimento sob inspeção municipal, localizado no Município de Teresina-PI, transportados até o laboratório em um recipiente térmico com solução DMPBS - FLUSH (Nutricell®) a uma temperatura de 37°C. O tempo entre a obtenção dos ovários até a manipulação em laboratório não foi superior a 2 horas. No laboratório, os ovários foram lavados com solução DMPBS - FLUSH (Nutricell®) a 37°C e os complexos cumulus-oócitos (CCOs) recuperados por aspiração dos folículos antrais, utilizando agulha descartáveis 25 x 8 mm

(21G), acoplado a uma seringa de 3mL. O líquido folicular obtido foi colocado em um tubo do tipo Falcon de 15mL e armazenado em banho-maria a 37°C, durante 10 minutos para sedimentação.

O conteúdo do aspirado folicular foi depositado em uma placa de Petri de 100 x 20 mm para rastreamento dos CCOs sob uma lupa estereomicroscópica. Os CCOs selecionados foram transferidos para uma placa de Petri 30 x 10 mm contendo meio de manutenção TQC Holding Plus (Biodux[®]), e classificados de acordo com a qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV (Leidfried; First, 1979). Somente os CCOs viáveis (Grau I e II) foram selecionados e submetidos, de acordo com os tratamentos, às fases seguintes do processo de produção de embriões in vitro, que se inicia com a maturação in vitro.

Maturação in vitro (MIV)

Os CCOs selecionados, foram lavados em meio de maturação (Gene Up Biotecnologia[®]), em placas de Petri 100 x 20 mm e maturados de acordo com o tratamento, em microgotas contendo 100 µL de meio de maturação (Gene Up Biotecnologia[®]), composto por TCM 199 e 10% de soro fetal bovino (SFB), sob óleo mineral em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, a 38,5 °C por um período de 22 horas.

Fertilização in vitro (FIV)

Os CCOs maturados foram lavados três vezes em de meio de fertilização (Gene Up Biotecnologia[®]), constituído por heparina, PHE (penicilina, hipotaurina e epinefrina) e albumina sérica bovina (BSA) (Gene Up Biotecnologia[®]). O sêmen foi descongelado em água a 37 °C por 30 segundos, sendo em seguida depositado em um microtubo de 2 mL, sobre um gradiente de Percoll de 90 e 45% (Gene Up Biotecnologia[®]), e submetido a centrifugação em 8000 rpm durante 7 minutos. Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante, os espermatozoides ressuspendidos em 1mL de meio de fertilização (Gene Up Biotecnologia[®]), e submetidos a nova centrifugação durante 5 minutos a 3200 rpm. Após a segunda centrifugação, o excesso de meio de capacitação foi retirado, sendo adicionada do mesmo volume de meio de fecundação (Gene Up Biotecnologia[®]) suplementado com 20 µL de heparina e 40 µL de PHE (Gene Up Biotecnologia[®]). Em seguida foram retirados 5 µL de pellet de sêmen, colocado em um microtubo contendo 250 µL de água destilada, para determinação da concentração espermática, pela contagem de células espermáticas em câmara de Neubauer. A concentração espermática foi ajustada

para 1×10^6 espermatozoides vivos/mL. Posteriormente, os CCOs e os espermatozoides foram co-incubados em temperatura de 38,5°C por 20 horas, em 5% de CO₂ em ar.

Cultivo in vitro (CIV)

Após a FIV, os presumíveis zigotos foram isolados das células do cumulus mediante sucessivas aspirações. Em seguida foram lavados três vezes em meio SOF (Gene Up Biotecnologia[®]), suplementado com 5% de SFB. Posteriormente foram transferidos para uma placa de Petri 60 x 15 mm, contendo microgotas de 100 µL de meio SOF (Gene Up Biotecnologia[®]) suplementado com 5% de SFB e mantidos em estufa à temperatura de 38,5°C, em 5% de CO₂, durante 7 dias. No quinto dia de cultivo foi realizado o “*feeding*”, que é a troca de 50% do meio SOF por um novo meio previamente estabilizado. A avaliação da taxa de clivagem foi realizada após 48 horas (D3) do início do cultivo e a formação de blastocisto após 168 horas (D7). A qualidade das estruturas encontradas no D7 foi realizada através da avaliação morfológica dos embriões estabelecidos pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS), de acordo com Bó e Mapletoft, (2013).

Avaliação da qualidade dos embriões – Protocolo de coloração diferencial de células

Para a avaliação da qualidade dos embriões foi utilizada a técnica de coloração com reagentes Hoechst 33342 (H33342) (Sigma[®]) e Iodeto de propídeo (IP) (Sigma[®]) de acordo com a metodologia empregada por Kawamoto et al. (2019).

A análise das lâminas foi realizada através da visualização em microscópio de fluorescência sob luz ultravioleta com excitação de 460 nm para o H33342 e 560 nm para o IP. A posterior avaliação das imagens obtidas das lâminas foi realizada através da utilização do *software* ImageJ[®], o qual possibilitou a realização da contagem das células da massa celular interna (MCI), células do trofoblasto (TE) e o número total de células (TC). Com a obtenção dos dados das variáveis MCI e o número total de células foi realizado o cálculo da proporção MCI e TC (%) e posterior avaliação dos embriões que se enquadram dentro dos seguintes extratos: 0-20%, 20-40% e >40%, de MCI em relação a TC (Kawamoto et al., 2019).

Análise Estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado e os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis ao nível de 5% de probabilidade, já para os dados paramétricos foi realizado ANOVA e para a comparação de médias o teste de Holm-

Sidak. Os resultados foram expressos como média para dados paramétricos e porcentagem para os não paramétricos. Os dados foram avaliados pelo programa SigmaStat versão 3.5 (Systat Software, Inc).

Resultados

Neste estudo verificou-se a ação da inibição na produção de Ang II com enalaprilato e do bloqueio do receptor de Ang-(1-7) com o A-779, bem como a associação dessas duas substâncias, adicionados aos meios de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* de oócitos e embriões bovinos. Observou-se que a taxa de clivagem não apresentou diferença significativa entre os tratamentos e em relação ao controle (88,33%), conforme a tabela 1.

Tabela 1: Taxa de clivagem de oócitos bovinos, cultivados em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de enalaprilato e A-779.

Grupos	Controle	A-779 a 2 μ M	Enal. a 2 μ M	Enal. + A-779 a 2 μ M
Taxa de clivagem	88,33% (108/122)	86,33% (100/116)	80,66% (87/108)	82,66% (100/121)

Variável avaliada pelo teste de Kruskal Wallis, não houve diferença significativa a 5% de probabilidade, $p > 0,05$.

A taxa de blastocisto foi avaliada no sétimo dia de cultivo (D7), os resultados demonstraram que não houve efeito significativo ($p > 0,05$) da adição do enalaprilato e do A-779, bem como sua associação aos meios, de produção *in vitro* de embriões (Tabela 2).

Tabela 2: Taxa de blastocisto e estruturas encontradas no D7 de oócitos bovinos, cultivados em meio acrescidos de enalaprilato e A-779.

Estruturas	Controle	A-779 a 2 µM	Enal. a 2 µM	Enal. + A-779 a 2 µM
Mórula C.	2	0	0	0
Blastocisto inicial	33	28	14	32
Blastocisto	59	60	41	58
Blastocisto expandido	15	16	25	18
Infertilizados	2	5	4	1
Taxa de blastocisto (%)	88,42% (107/121)	88,13% (104/118)	73,39% (80/109)	89,25% (108/121)

Variável avaliada pelo teste de Kruskal Wallis, não houve diferença significativa a 5% de probabilidade, $p > 0,05$.

A avaliação da qualidade dos embriões foi realizada por meio da avaliação morfológica e do protocolo de coloração diferencial de células. A tabela 3 apresenta os resultados referentes a avaliação morfológica da qualidade dos embriões, os quais não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Entretanto, quando avaliado individualmente cada tratamento apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na qualidade das estruturas encontradas no sétimo dia do cultivo, sendo a maior parte dos embriões de qualidade excelente (Tabela 3), indicando a eficiência do protocolo utilizado para a PIV.

Tabela 3: Classificação da qualidade dos blastocistos bovinos no D7 submetidos ao tratamento com meios acrescido de enalaprilato e A-779.

Qualidade	Controle	A-779 a 2 µM	Enal. a 2 µM	Enal. + A-779 a 2 µM
Excelente	12,50±1,33 ^a	11,33±1,33 ^a	8,50±1,33 ^a	12,33±1,33 ^a
Bom	3,33±1,33 ^b	1,83±1,33 ^b	1,16±1,33 ^b	2,67±1,33 ^b
Pobre	2,00±1,33 ^b	4,33±1,33 ^b	3,83±1,33 ^b	2,67±1,33 ^b
Infertilizados /degenerados	0,50±1,33 ^c	1,16±1,33 ^b	0,67±1,33 ^b	1,00±1,33 ^b

^{a, b} Média ± EPM com diferentes letras minúsculas na mesma coluna apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade, $p < 0,05$.

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos, por meio do protocolo de coloração diferencial de células, para as variáveis massa celular interna (MCI), número total de

células (TC) e a proporção MCI/TC. Foi observado que o número de células da MCI no tratamento A-779 a 2 μ M ($73,25 \pm 10,0$) apresentou uma maior quantidade de células com relação aos demais tratamentos, porém os demais tratamentos também foram diferentes entre si e superiores ao controle ($p < 0,05$). Na variável número de células do trofoblasto (TE), os tratamentos foram superiores ao controle ($p < 0,05$), mostrando que os tratamentos aumentaram a quantidade de células do trofoblasto. Para a variável número total de células (TC), também os tratamentos foram superiores ao controle $p < 0,05$. Em relação à variável proporção MCI/TC, o A-779 a 2 μ M ($47,1 \pm 3,3$) apresentou resultado superior aos demais tratamentos (Tabela 4). Isso reflete o maior percentual de células MCI em relação ao total de células do embrião.

Tabela 4: Variáveis de alocação celular de embriões produzidos em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de enalaprilato e A-779.

Variável	Controle	A-779 a 2 μ M	Enal. a 2 μ M	Enal. + A-779 a 2 μ M
Número de células da MCI	$25,6 \pm 4,4^d$	$73,25 \pm 10,0^a$	$41,65 \pm 4,97^b$	$33,66 \pm 5,5^c$
Número de células do TE	$38,6 \pm 10,0^b$	$82,2 \pm 10,9^a$	$77,7 \pm 12,2^a$	$88,3 \pm 18,6^a$
Número total de células (TC)	$64,3 \pm 14,4^b$	$155,5 \pm 19,1^a$	$129,18 \pm 14,8^a$	$122 \pm 24,2^a$
Proporção MCI/TC (%)	$39,8 \pm 2,4^b$	$47,1 \pm 3,3^a$	$32,2 \pm 3,52^b$	$27,5 \pm 1,1^b$

^{a,b} Média \pm EPM com diferentes letras minúsculas na mesma linha apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). MCI: massa celular interna; TE: número de células trofoblasto; TC: total de células.

Todavia, quando foram analisados os resultados da proporção de embriões com a quantidade de células dentro do limite adequado (20-40%) verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$), onde o tratamento enalaprilato a 2 μ M + A-779 a 2 μ M (100%) apresentou a maior quantidade de embriões com células dentro do limite adequado, em relação aos demais tratamentos (Tabela 5), sendo que o grupo controle apresentou a menor proporção de embriões nessa faixa. Já para os embriões considerados fora da proporção adequada, com proporção inferior a 20 e superior a 40%, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$), sendo que apenas um embrião teve proporção inferior a 20% (Tabela 5).

Tabela 5: Proporções de MCI/TC (%) de embriões produzidos em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de enalaprilato e A-779.

MCI/TC	Controle	A-779 a 2 μ M	Enal. a 2 μ M	Enal. A 2 μ M + A-779 a 2 μ M
0-20%	0	0	1 (5%)	0
20-40%	5 (33,3%) ^c	8 (50%) ^b	13 (65%) ^b	18 (100%) ^a
40-60%	10 (66,7%)	8 (50%)	6 (30%)	0

^{a,b} Diferentes letras na mesma linha indicam diferença estatística por Qui-Quadrado, $p < 0,05$. MCI: massa celular interna; TE: trofoblasto; TC: total de células

Discussão

Os resultados obtidos para a taxa de clivagem demonstraram que a adição de enalaprilato, A-779, bem como a associação entre enalaprilato a 2 μ M + A-779 a 2 μ M aos meios de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* de embriões bovinos não apresentaram efeito significativo para esta variável (tabela 1). Com relação à taxa de blastocisto, também não houve alteração significativa nos tratamentos em relação ao controle (tabela 2). Quando avaliada a qualidade dos blastocistos, pelo critério morfológico, também não foi observado alteração significativa em relação ao grupo controle (tabela 3).

O enalaprilato, forma ativa do enalapril após ser hidrolisado pelo fígado, possui o potencial para inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA) mais significativamente do que o enalapril (Thongnopnua; Poeaknapo, 2005). A ECA foi encontrada na superfície folicular, no corpo lúteo e na zona pelúcida, evidenciando sua ação durante o desenvolvimento folicular, angiogênese e maturação dos oócitos (Brentjens et al., 1986; Shauser et al., 2001). Além disso, a função mais importante da ECA é a conversão da angiotensina I em angiotensina II (Ang-II), que está presente nas células da granulosa e, do mesmo modo, está associada ao processo de angiogênese, durante a ovulação, a formação do corpo lúteo e atua no mecanismo de controle autócrino e parácrino durante a ovulação em suínos, coelhos e vacas (Ferreira et al., 2011; Stefanello et al., 2006; Li et al., 2004; Acosta et al., 2000; Feral et al., 1995). Portanto, a ECA esta presente nos mesmos locais de ação da Ang-II, aumentando a formação de Ang-II e alterando o desenvolvimento dos folículos e conseqüentemente a ovulação (Pan et al., 2013). Nossos resultados utilizando somente enalaprilato adicionado aos meios de maturação, fertilização e cultivo de embriões *in vitro* demonstraram que não houve efeito sobre a taxa

de clivagem, embora a provável diminuição da Ang-II poderia ter reduzido a taxa de blastocisto já que a mesma pode agir na formação de blastocistos, atuando na maturação dos oócitos através das células da teca (Stefanello et al., 2006). No entanto, isso não ocorreu provavelmente porque as células da teca não estavam presentes nesse experimento de cultivo *in vitro*, onde foram utilizados apenas o complexo cumulus-oócito (CCO).

Ao inibir a ECA ocorre a diminuição da disponibilidade de Ang-II e subsequente estimulação de outros peptídeos do sistema renina-angiotensina como a angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)), podendo apresentar efeitos positivos na atividade ovariana, estimulando a produção de estradiol e melhora na eficiência ovulatória, porém, seu antagonista o A-779 bloqueia esses efeitos (Tonelloto dos Santos et al., 2011; Viana et al., 2011). Isso seria um resultado esperado, considerando que experimentos *in vivo*, com inibição da ECA, em pesquisas realizadas em nosso laboratório, utilizando o enalapril, inibidor da ECA, foi observado o aumento no número de embriões caprinos transferíveis e a melhora de sua qualidade, além do aumento no número de gestações e produtos nascidos por transferência de embriões (Oliveira, 2003; Feitosa, 2010). Além disso, a Ang-(1-7) e seu receptor MAS atuam estimulando a esteroidogênese ovariana e modulando as funções da fisiologia ovariana, como: o desenvolvimento folicular, ovulação, atresia e maturação dos oócitos em ratos (Costa et al., 2003). Tonelloto dos Santos et al. (2012; 2011), identificou a proteína do receptor MAS no ovário de vacas nas células da granulosa de folículo pré-ovulatório em cultivo *in vitro* e no líquido folicular através da expressão de RNAm para o receptor Mas. Além disso, a Ang-(1-7) promove a retomada meiótica nos oócitos do folículo, e as gonadotrofinas regulam positivamente o eixo ACE2 / ANG- (1-7) / MAS. O A-779, inibidor específico da Ang-(1-7) / MAS, reduziu a porcentagem de quebra da vesícula germinativa nos oócitos estimulados pelo hormônio luteinizante, sugerindo que o efeito da gonadotrofina no processo ovulatório ocorre, em parte, pela ativação do receptor MAS (Honorato Sampaio et al., 2018).

No presente estudo utilizou-se o A-779 com o intuito de inibir a Ang-(1-7) presente nos oócitos e a Ang-(1-7) proveniente da possível produção através da inibição da Ang-II pelo enalaprilato. Os resultados encontrados sugerem que não houve efeito do A-779 bem como de sua associação com o enalaprilato nas taxas de clivagem e blastocisto. Em estudos realizados utilizando o A-779 em bovinos também não foi observado efeito sobre a ovulação e alteração na expressão de Ereg (marcador inicial da

cascata de ovulação) quando o receptor da Ang-(1-7) foi bloqueado (Tonelloto dos Santos et al., 2012).

A qualidade dos embriões também foi analisada quanto à quantidade e proporção de células presentes no D7, onde foi observado aumento da massa celular interna (MCI) e aumento da proporção entre a MCI e total de células (TC) e no tratamento com A-779. Esse aumento se verificou tanto em relação ao grupo controle, como aos demais tratamentos. Já em relação a variável número de células do trofoblasto (TE) e TC os tratamentos com A-779, enalaprilato e associação entre eles apresentaram maior número de células em relação ao controle. Isso parece evidenciar que tanto o A-779, quanto o enalaprilato, isolados ou em associação, favoreceram o aumento do número de células presentes nos embriões.

Em geral, o embrião é considerado de melhor qualidade quando apresenta um maior número de células, porém existem embriões no mesmo estágio de desenvolvimento, apresentando diferentes tamanhos e diferente número total de células. Entretanto, quando analisadas as proporções de células da MCI e do TE, verifica-se que apesar do número total de células diferentes os embriões podem apresentar proporções celulares dentro da normalidade e assim terem qualidade semelhante (Kawamoto et al., 2019). Verificou-se que os resultados da presente pesquisa, corroboram com a afirmação anterior, pois foram observados tratamentos com diferentes números para MCI, TE e TC e quando foi analisada a proporção entre MCI e TC observou-se que 100% dos embriões do tratamento Enal a 2 μ M +A779, 65% dos tratados com Enal a 2 μ M, 50% do tratados com A-779 e apenas 33,3% do grupo controle estavam dentro da faixa de 20 a 40% de células da MCI, considerada de melhor qualidade.

Assim, apesar de os tratamentos terem apresentado resultados semelhantes na taxa de clivagem, taxa de blastocisto e avaliação morfológica, na proporção de células MCI em relação a TC, observa-se que o tratamento com enalaprilato associado ao A-779 e, em menor grau, os tratamentos com A779 e enalaprilato isoladamente, incrementaram a qualidade dos embriões. Com isso, há indicação de que tanto a antagonização do receptor MAS quando a inibição da produção de Ang II favorecem a qualidade dos embriões, pelo critério da proporção de células presentes no embrião no D7.

A avaliação da qualidade embrionária em relação às proporções dos diferentes tipos celulares é considerada mais consistente, onde embriões com proporção entre MCI e TC entre 20-40% são considerados de boa qualidade e aqueles com proporção abaixo

de 20 e acima de 40% estão associados com perdas embrionárias (Zullo et al., 2016; Velazquez et al., 2012; Koo et al., 2002).

Conclui-se que tanto o A-779, quanto o enalaprilato, isolados ou em associação, favoreceram proliferação das células embrionárias e que o A-779 propicia uma proporção mais adequada entre elas e uma maior qualidade embrionária.

Referências

Acosta, T. J., Ozawa, T., Kobayashi, S., Hayashi, K., Ohtani, M., Kraetzel, W. D., Sato, K., Schams, D., Miyamoto, A. (2000). Periovulatory changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin F₂ α , and steroid hormones from bovine mature follicles in vivo. **Biology of Reproduction**, 63, 1253–1261.

Bó, G. A., Mapletoft, R. J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. **Animal Reproduction**, 10, 344-348.

Brentjens, J. R., Matsuo, S., Andres, G. A., Caldwell, P. R., & Zamboni, L. (1986). Gametes contain angiotensin converting enzyme (kininase II). **Experimentia**, 42, 399–402.

Brosnihan, K. B., Senanayake, P. S., Li, P., Ferrario, C. M. (1999). Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 32, 373-381.

Costa, A. P., Fagundes-Moura, C. R., Pereira, V. M., Silva, L. F., Vieira, M. A., Santos, R. A., Dos Reis, A. M. (2003). Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. **Endocrinology**, 144, 1942-1948.

Costa, A. S., Junior, A. S., Viana, G. E. N., Muratori, M. C. S., Reis, A. M., Costa, A. P. R. (2014). Inhibition of Angiotensin- Converting Enzyme increases oestradiol production in ewes submitted to oestrus synchronization protocol. **Reproduction in Domestic Animals**, 49, e53–e55.

Feitosa, L.C.S. (2010). **Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) na produção de embriões por superovulação em cabras Boer**. 2010. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Teresina, PI: Universidade Federal do Piauí.

Feral, C., le Gall, S., Leymarie, P. (1995). Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: Its possible involvement in atresia. **European Journal of Endocrinology**, 133, 747–753.

Fernandes Neto, V. P., Silva, M. N. N., Costa, A. S., Kunkel, D., Sousa Júnior, A., Feitosa, L. C. S., Muratori, M. C. S., Costa A. P. R. (2018), ACE inhibition in goats under fixed- time artificial insemination protocol increases the pregnancy rate and twin births. **Reproduction in Domestic Animals**, 53, 1006-1008.

Ferreira, R., Gasperin, B., Rovani, M., Santos, J., Barreta, M., Bohrer, R., Price, C., Gonçalves, P.B.D. (2011). Angiotensin II signaling promotes follicle growth and dominance in cattle. **Endocrinology**, 152, 4957–4965.

Gonçalves, P. B. D., Barreta, M. B., Sandri, L. R., Ferreira, R., Antoniazzi, A. Q. (2007). Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, 31, 212-217.

Honorato-Sampaio, K., Pereira, V.M., Santos, R.A.S., Reis, A.M. (2012). Evidence that an-giotensin-(1-7) is an intermediate of gonadotrophin-induced oocyte maturation in the rat preovulatory follicle. **Experimental Physiology**, 97, 642-650.

Honorato-Sampaio, K., Andrade, R. F., Bader, M., Martins, A. S., Santos, R. A. S., Reis, A. M. (2018). Genetic deletion of the Angiotensin-(1–7) receptor Mas leads to a reduced ovulatory rate. **Peptides**, 107, 83-88.

Kawamoto, T. S., Pontello, P. T., Figueiredo, R. A., Dode, M. A. N. (2019). Coloração diferencial de células para avaliação da qualidade de embriões bovinos. **Documentos Embrapa** 363, p.33, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília – DF.

Koo, D. B., Kang, Y. K., Choi, Y. H., Park, J. S., Kim, H. N., Oh, K. B., Son, D. S., Park, H., Lee, K. K., Han, Y. M. (2002). Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. **Biology of Reproduction**, 67, 487–92.

Leibfried-Rutledge, M. L., First, N. L. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal of Animal Science**, 83, 76-86.

Li, Y., Jiao, L., Liu, R., Chen, X., Wang, H., Wang, W. (2004). Localization of angiotensin II in pig ovary and its effects on oocyte maturation in vitro. **Theriogenology**, 61, 447–459.

Obermüller, N., Gentili, M., Gauer, S., Gretz, N., Weigel, M., Geiger, H., Gassler, N. (2004). Immunohistochemical and mRNA localization of the angiotensin ii receptor subtype 2 (at2) in follicular granulosa cells of the rat ovary. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, 52, 545-548.

Oliveira, P. F. N. M. (2003). **Efeito do enalapril e da somatotropina recombinante bovina na superovulação em caprinos**. 2003. 65p. Dissertação (mestrado em Ciência Animal). Teresina, PI: Universidade Federal do Piauí.

Pan, P. P., Qi-Tao, Z., Fang, L., Ying-Ming, Z., Fan J. (2013). Angiotensin-converting enzyme play dominant rule in fertility. **International Journal of Molecular Sciences**, 14, 21071-21086.

Peña, O., Palumbo, A., González-Fernández, R., Hernández, J., Naftolin, F., Ávila, J. (2010). Expression of angiotensin II type 1 (AT1) and angiotensin II type 2 (AT2) receptors in the human granulosa-lutein (GL) cells: correlation with infertility diagnoses. **Fertility and Sterility**, 93, 1601-1608.

Pereira, V. M., Reis, F.M., Santos, R. A. S., Cassali, G. D., Santos, S. H. S., Honorato-Sampaio, K., Dos Reis, A. M. (2009). Gonadotropin stimulation increases the expression of an-giotensin-(1– 7) and MAS receptor in the rat ovary, **Reproductive Sciences**, 16 1165–1174.

Pereira, A. M., Souza Júnior A., Machado, F. B., Gonçalves, G. K. N., Feitosa, L. C. S., Reis, A. M., Santos, R. A. S., Honorato-Sampaio, K., Costa, A. P. R. (2015). The effect of angio-tensin-converting enzyme inhibition throughout a superovulation protocol in ewes, **Research in Veterinary Science**, 103, 205–210.

Raposo-Costa, A. P., Reis, A. M. (2000). O sistema Renina-Angiotensina em ovário. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, 44, 306-313.

Reis, F. M., Bouissou, D. R., Pereira, V. M., Camargos, A. F., Reis, A. M., Santos, R.A. (2011). Angiotensin-(1-7), its receptor Mas, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary, **Fertility and Sterility**, 95, 176-181.

Schauser, K. H., Nielsen, A. H., Winther, H., Dantzer, V., Poulsen, K. (2001). Localization of the renin-angiotensin system in the bovine ovary: cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. **Biology of Reproduction**, 65, 1672-1680.

Stefanello, J. R., Barreta, M. H., Porciuncula, P. M., Arruda, J. N., Oliveira, J. F., Oliveira, M. A., Gonçalves, P. B. (2006). Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. **Theriogenology**, 66, 2068–2076.

Tavares, M. T., Primia, M. C., Pollib, M. C., Ferreira, E. I., Parise-Filho, R. (2015). Interações fármaco-receptor: aplicações de técnicas computacionais em aula prática sobre a evolução dos inibidores da enzima conversora de angiotensina. **Química Nova**, 38, 1117-1124.

Thongnopnua, P., Poeaknapo, C. (2005). High-performance liquid chromatographic determination of enalapril in human plasma by enzyme kinetic analytical method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 37, 763-769.

Tonellotto dos Santos, J., Ferreira, R., Gasperin, B. G., Siqueira, L. C., Oliveira, J. F., Santos, R. A. S., Reis, A. M., Gonçalves, P. B. (2011). Molecular characterization and regulation of the angiotensin converting enzyme type 2/angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. **Journal of the Renin Angiotensin Aldosterone System**, 13, 91–98.

Tonelloto dos Santos, J., Gasperin, B. G., Rissi, V. B., De Cesaro, M. P., Cezar A. S., Oliveira, J. F. C., Gonçalves, P. B. D. (2012). Angiotensina-(1-7) durante o processo inicial na cascata da ovulação em bovinos. **Ciência Rural**, 42, 1876-1881.

Velazquez, M. A., Hadelar, K. G., Herrmann, D., Kues, W. A., Rémy, B., Beckers, J. F., Niemann, H. (2012). In vivo oocyte IGF-1 priming increases inner cell mass proliferation of in vitro-formed bovine blastocysts. **Theriogenology**, 78, 517-527.

Viana, G. E. N., Pereira, V. M., Honorato-Sampaio, K., Oliveira, C. A., Santos, R. A. S., Reis, A. (2011). Angiotensin-(1-7) induces ovulation and steroidogenesis in perfused rabbit ovaries. **Experimental Physiology**, 96, 957-965.

Yoshimura, Y., Karube, M., Aoki, H., Oda, T., Koyama, N., Nagai, A., Akimoto, Y., Hirano, H., Nakamura, Y. (1996). Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT₂ receptor subtype. **Endocrinology**, 137, 1204-11.

Zullo, G., Albero, G., Neglia, G., De Canditiis, C., Bifulco, G., Campanile, G., Gasparini, B. (2016). L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro-produced embryos. **Theriogenology**, 85, 688-697.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados encontrados em nosso estudo recomendamos a continuidade dos trabalhos.

Para o capítulo 1 e 2 recomenda-se mais pesquisas com a finalidade de verificar uma possível ação antioxidante do enalaprilato através de testes adequados, assim como sua ação sob a qualidade dos embriões.

Em relação ao capítulo 3 são necessárias as realizações de mais testes pois realizamos um estudo piloto, e ainda é imprescindível verificar a eficácia da liberação e absorção do gel de enalapril no trato reprodutivo da fêmea, bem como seu efeito na taxa de ovulação e prenhez em bovinos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- ALI, S. M.; MAHESHWARI, A.; ASMAT, F. Complexation of enalapril maleate with β -cyclodextrin: NMR spectroscopic study in solution. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 685-688, 2006.
- ASHKENAZI, H.; CAO, X.; MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; CONTI, M.; TSAFRIRI, A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology**, v. 146, p. 77-84, 2005.
- BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, p.54-62, 1995.
- BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Dinamica Folicular Ovária em El Bovino: In **Controle Farmacológico do Ciclo Estral em Ruminantes**, 2000, São Paulo.
- BÓ, G.A.; CUTAIA, L. Implementacion de programas de inseminación artificial em rodeos de cria. **Anais....Cordoba**, 2006.
- BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, v.47, p.1221-1236, 1997.
- BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; STEFFEN, S.; STOLLA. The effect of acetylsalicylic acid and captopril on uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 61, p. 301-309, 2004.
- BREVINI-GANDOLFI, T.A.L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, p.1255-1276, 2001.
- BRENTJENS, J. R.; MATSUO, S.; ANDRES, G. A.; CALDWELL, P. R.; & ZAMBONI, L. Gametes contain angiotensin converting enzyme (kininase II). **Experimentia**, v.42, p.399-402, 1986.
- BROSNIHAN, K. B.; NEVES, L. A. A.; ANTON, L.; JOYNER, J.; VALDES, G.; MERRIL, D.C. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1255-1262, 2004.
- BUENO, A.P.; BELTRAN, M.P. Produção in vitro de embriões bovinos. **Revista Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.11, p.1-7, 2008.
- BURATINI, J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BÓ, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v.54, p. 421-432, 2000.
- BURREL, L. M.; JOHNSTON, C. I.; TIKELLIS, C.; COOPER, M. E. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.15, p.166-169, 2004.
- CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VIANA, J.H.M. Efeito de sistema de cultivo, célula somática e soro em co-cultura sobre o desenvolvimento de embriões

bovinos fecundados in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, 2001.

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.-Y.; SU, Y.-Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molecular Endocrinology**, v. 20, p. 715-723, 2006.

CORBET, N.J.; MILLER, R.G.; BINDON, B.M. Synchronization of estrus and fertility in zebu beef heifers treated with three estrus synchronization protocols. **Theriogenology**, v. 51, p.647-659, 1999.

COSTA, A. P.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; PEREIRA, V. M.; SILVA, L. F.; VIEIRA, M. A.; SANTOS, R. A.; DOS REIS, A. M. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. **Endocrinology**, v.144, p.1942-1948, 2003.

COSTA, A. S.; JUNIOR, A. S.; VIANA, G. E. N., MURATORI, M. C. S.; REIS, A. M.; COSTA, A. P. R. Inhibition of angiotensin-converting enzyme increases oestradiol production in ewes submitted to oestrous synchronization protocol. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49. P. e53-e55, 2014.

DAUD, A. L.; BUMPUS, F. M.; HUSAIN, A. Characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE) containing follicles in the rat ovary during the estrous cycle and effects of the ACE inhibitor on ovulation. **Endocrinology**, v. 126, p. 2927-2935, 1990.

DISKIN, M.G.; AUSTIN, E.J. AND ROCHE, J.F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 211-228, 2002.

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzyme related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation Research**, v. 87, p. E1-E9, 2000.

FEITOSA, L.C.S. (2010). **Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) na produção de embriões por superovulação em cabras Boer**. 2010. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Teresina, PI: Universidade Federal do Piauí.

FERNANDES NETO, V. P., SILVA, M. N. N., COSTA, A. S., KUNKEL, D., SOUSA JÚNIOR, A., FEITOSA, L. C. S., MURATORI, M. C. S., COSTA A. P. R. ACE inhibition in goats under fixed-time artificial insemination protocol increases the pregnancy rate and twin births. **Reproduction in Domestic Animals**, v.53, p.1006-1008, 2018

FERREIRA, R.; GASPERIN, B.; SANTOS, J.; ROVANI, M.; SANTOS, R. A.; GUTIERREZ, K.; OLIVEIRA, J. F.; REIS, A. M.; GONÇALVES, P. B. Angiotensin II profile and mRNA encoding RAS proteins during bovine follicular wave. **Journal of the Renin Angiotensin Aldosterone System**, v.12, p. 475-482, 2011.

FRANCIOSI, F.; MANANDHAR, S.; CONTI, M. FSH regulates mRNA translation in mouse oocytes and promotes developmental competence. **Endocrinology**, v. 157, p. 872-882, 2016.

- GANDHI, A.P.; LANE, M.; GARDNER, D.K.; KRISHER, R.L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reproduction**, v.15, p.395-401, 2000.
- GIBBONS, J.R.; BEAL, W.E.; KRISHER, R.L.; FABER, E. G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, v.42, p.405419, 1994.
- GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.B.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.31, p.212-217, 2007.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. 2 ed., São Paulo: Roca, 2008.
- GONÇALVES, P. B.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B.; OLIVEIRA, J. F. Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: A review of recent advances. **Reproduction**, v.143, p.11-20, 2012.
- GONZÁLEZ, F.H.D. Endocrinologia Reprodutiva da Fêmea. **In: Introdução a Endocrinologia Veterinária**. Porto Alegre, 2002.
- GREGORY, R.M.; MELO, L.C.; BESKOW A. Dinâmica folicular e uso de hormonioterapias na regulação do ciclo estral na vaca. CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais....Belo Horizonte: CBRA, 2009. 1 CD-ROM**.
- GREGORY, R.M.; Métodos de sincronização de estros em bovinos. In: SIMPÓSIO DE REPRODUÇÃO BOVINA E SINCRONIZAÇÃO DE ESTROS EM BOVINOS, 1, Porto Alegre, RS, **Anais...Porto Alegre: Gráfica Jacuí, p.18-24, 2022**.
- HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7.ed., São Paulo: Manole. 509p. 2004.
- HUSAIN, A.; BUMPUS, F. M.; SILVA, P. D.; SPETH, R. C. Localization of angiotensina II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensina II in rat ovaries. **Proceedings of the National Academy Science**, v.84, p.2489-2493, 1987.
- IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal Reproductive and Fertility**, v.50, p.119-121, 1977.
- JACKSON, E.K. Renina e angiotensina. **In: BRUTON et al.(ed). Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Porto Alegre, AMGH Editora, 2010.
- LEUNG, P. S.; SERNIA, C. The renin-angiotensin system and male reproduction: New functions for old hormones. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 30, p. 263-270, 2003.
- LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; KHATIR. H.; MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. **Bio Reprod**, v.54, p.1420-1429, 1996.

- MATSUI, M.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor. **Theriogenology**, v.48, p.605-616, 1997.
- MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; SOUSA, S.L.G.; MELLO, R.B.; PALHANO, H.B. Produção in vitro (PIV) de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v.40, p.58-64, 2016.
- MINAMI, N. Early embryonic development under oviductal influence in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.361-369, 1996.
- MORRIS, R.S.; PAULSON, R.J.; LINDHEIM, S.R.; LEGRO, R.S.; LOBO, R.A.; SAUER, M.V. Angiotensin-converting enzyme inhibition reverses luteal phase steroid production in oocyte donors. **Fertility and Sterility**, v.63, p.854-858, 1995.
- OLIVEIRA, P. F. N. M. (2003). **Efeito do enalapril e da somatotropina recombinante bovina na superovulação em caprinos**. 2003. 65p. Dissertação (mestrado em Ciência Animal). Teresina, PI: Universidade Federal do Piauí.
- PALUMBO, A.; AVILA, J.; NAFTOLIN, F. The ovarian renin-angiotensin system (OVRAS): A major factor in ovarian function and disease. **Reproduction Sciences**, v. 23, p.1644-1655, 2016.
- PAN, P. P.; ZHAN, Q. T.; LE, F.; ZHENG, Y. M.; JIN, F. Angiotensin converting enzymes play a dominant role in fertility. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 21071-21086, 2013.
- PELLICER, A.; PALUMBO, A.; DECHERNEY, A. H.; NAFTOLIN, F. Blockade of ovulation by an angiotensin antagonist. **Science**, v. 240, p. 1660-1, 1988.
- PEREIRA BARRETTO, A.C. Da fisiopatologia à prática clínica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 9, p. 35-44, 1999.
- PEREIRA, A. M.; SOUZA JÚNIOR, A.; MACHADO, F. B.; GONÇALVES, G. K. N.; FEITOSA, L. C. S.; REIS, A. M.; SANTOS, R. A.S.; HONORATO-SAMPAIO, K.; COSTA, A. R. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition throughout a superovulation protocol in ewes. **Research in Veterinary Science**, v.103, p.205-210, 2015.
- PETERSON, C. M.; MORIOKA, N.; ZHU, C.; RYAN, J. W.; LeMARIE, W. J. Angiotensin-converting enzyme inhibitors have no effect on ovulation and the ovarian steroidogenesis in the perfused rat ovary. **Reproduction Toxicology**, v.7, p.131-135, 1993.
- RAINEY, W.E.; BIRD, I.M.; BYRD, W.; CARR, B.R. Effect of angiotensin II on human luteinized granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v, 59, p.143-147, 1993.
- RAPOSO-COSTA, A. P.; REIS, A. M. O sistema Renina-Angiotensina em ovário. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.44, n.4, p.306-313, 2000.
- REIS, A. B.; ARAÚJO, F. C.; PEREIRA, V. M.; DOS REIS, A. M.; SANTOS, R. A.; REIAS, F. M. Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility. **Journal of Molecular Histology**, v. 41, p. 75-80, 2010.

- RELLA, M.; ELLIOT, J. L.; REVETT, T. J.; PHELAN, A.; JACKSON, R. M.; TURNER, A. J.; HOOPER, N. M. Identification and characterisation of angiotensin convertin enzyme 3 (ACE3) gene: A novel mammalian homologue of ACE. **BMC Genomics**, v. 8, p.194-203, 2007.
- RIBEIRO, A.B.; PLAVNIK, F.L. **Atualização em hipertensão arterial- clínica, diagnóstico e terapêutica**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2007.
- RIBEIRO, J. M. Inibidores da enzima conversora da angiotensina e bloqueadores de receptores da angiotensina II no tratamento da hipertensão arterial. **Hipertensão**, v. 5, p.69-72, 2002.
- RICHARDS, J.S.; RUSSEL, D.L.; OCHSNER, S.; HSIEH, M.; DOYLE, K. H.; FALENDER, A.E.; LO, Y.K.; SHARMA, S.C. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and lutenization. **Recent Progress in Hormone Research**, v.57, p.195-220, 2002b.
- RICHARDS, J.S.; RUSSELL, D. L.; OCHSNER, S.; ESPEY, L. L. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. **Annual Review of Physiology**, v. 64, p.69-92, 2002a.
- ROSA, P. B. A. **Caracterização de um novo modelo de maturação de oócito in vitro e participação do mTOR na ovulação em bovinos**. 96 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2016.
- SAGAE, S. C.; GOBO, C.G.; PAZ, E. D. R.; MENEGOTTO, J. B.; YAMASHITA, P. K.; FRANCI, C. R.; BALBO, S. L. Bloqueio do receptor AT1 da angiotensina II reduz o numero de foliculos antrais em ratas com obesidade induzida por dieta de cafeteria. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 37, p. 302-7, 2015.
- SANTOS, R. A. S.; FAGUNDES-MOURA, C .R.; SILVA, A. C. S. Efeitos Cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.7, n.3, p.227- 236, 2000.
- SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; VERAONO-BRAGA, T.; BADER, M. Angiotensin-convertinng enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin angiotensin system. **Journal Endocrinology**, v. 216, p. R1-R17, 2013.
- SARTORI, R.; BARROS, C.M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 14, p. 244-250, 2011.
- SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1241-1254, 2001.
- SMETANINA, I.G.; TATARINOVA, L.V.; KRIVOKHARDCHENKO, A.S. The effect of the composition of the culture media on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. **Ontogenez**, v.31, p.139-143, 2000
- SPETH, R. C.; BUMPUS, F. M.; HUSAIN, A. Identification of angiotensin II receptors in the rat ovary. **European Journal of Pharmacology**, v. 130, p. 351-352, 1986.
- SPETH, R.; DAUBERT, D.; GROVE, K. Angiotensin II: A reproductive hormone too? **Regulatory Peptides**, v. 79, p. 25-40, 1999.

TAVARES, M. T.; PRIMIA, M. C.; POLLIB, M. C.; FERREIRA, E. I.; PARISE-FILHO, R. Interações fármaco-receptor: aplicações de técnicas computacionais em aula prática sobre a evolução dos inibidores da enzima conversora de angiotensina. **Química Nova**, v. 38, n. 8, p. 1117-1124, 2015.

THONGNOPNUA, P.; POEAKNAPO, C. High-performance liquid chromatographic determination of enalapril in human plasma by enzyme kinetic analytical method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 4, p. 763-769, 2005.

TONELLOTTO DOS SANTOS, J.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B. G.; SIQUEIRA, L. C.; OLIVEIRA, J. F.; SANTOS, R. A. S.; REIS, A. M.; GONÇALVES, P. B. Molecular characterization and regulation of the angiotensin converting enzyme type 2/angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. **Journal of the Renin Angiotensin Aldosterone System**, v.13, p. 91-98, 2011.

VAN DER HURK, R.; ZHAO, J. Regulation of mammalian oocyte growth and maturation. **Acta Science Veterinary**, v.31, p.188-205, 2003.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.100-109, 2008.

VIANA, G. E. N., PEREIRA, V. M., HONORATO-SAMPAIO, K., OLIVEIRA, C. A., SANTOS, R. A. S., REIS, A. Angiotensin-(1-7) induces ovulation and steroidogenesis in perfused rabbit ovaries. **Experimental Physiology**, v.96, p.957-965, 2011.

YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; AOKI, H.; ODA, T.; KOYAMA, N.; NAGAI, A.; AKIMOTO, Y.; HIRANO, H.; NAKAMURA, Y. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. **Endocrinology**, v. 137, p. 1204-11, 1996.

YOSHIMURA, Y.; KOYAMA, N.; KARUBE, M.; ODA, T.; AKIBA, M.; YOSHINAGA, A.; SHIOKAWA, S.; JINNO, M.; NAKAMURA, Y. Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. **Journal of Clinical Investigation**, v.93, p. 180-187, 1994.

ZANELLA, M. T.; A. B. RIBEIRO. The role of angiotensin II antagonism in type 2 diabetes mellitus: a review of renoprotection studies. **Clinical Therapeutics**, v.24, p.1019-34. 2002.